Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zu Prenyltransferasen und NRPS-ähnlichen Enzymen aus Ascomyceten

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sylwia Magdalena Tarcz
aus Breslau

Marburg/Lahn 2014

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 18. Juli 2014 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Shu-Ming Li
Zweitgutachter: Prof. Dr. Michael Keusgen

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juli 2014

Inhaltsverzeichnis

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Artikeln veröffentlicht:

Sylwia Tarcz, Xiulan Xie and Shu-Ming Li (2014)
Substrate and Catalytic Promiscuity of Secondary Metabolite Enzymes: *O*-Prenylation of Hydroxyxanthones with Different Prenyl Donors by a Bisindolyl Benzoquinone *C*- and *N*-Prenyltransferase.
RSC Advances 4: 17986–17992.

Sylwia Tarcz, Lena Ludwig and Shu-Ming Li (2014)
AstPT Catalyses both Reverse N1- and Regular C2 Prenylation of a Methylated Bisindolyl Benzoquinone.
ChemBioChem 15: 108–116.

Marco Jost, Georg Zocher, **Sylwia Tarcz**, Marco Matuschek, Xiulan Xie, Shu-Ming Li and Thilo Stehle (2010)
Structure-Function Analysis of an Enzymatic Prenyl Transfer Reaction Identifies a Reaction Chamber with Modifiable Specificity.
Journal of the American Chemical Society 50:17849–17858

Wissenschaftliche Vorträge

Sylwia Tarcz
Reverse N1- and Regular C2-Prenylation of Asterriquinone D by a Prenyltransferase from *Aspergillus terreus*
Doktorandentagung der Deutschen Pharmazeutischen Gesellschaft, 12. März 2014, Wuppertal

Abkürzungen

Physikalische Größen und ihre Einheiten wurden nach dem Internationalen Einheitensystem (SI; *Système international d'unités*) verwendet, ebenso wie ihre abgeleiteten Größen und Einheiten. Aminosäuren wurden nach dem Einbuchstaben- oder Dreibuchstabencode (IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature 1984) bezeichnet.

A	Adenin
ABC	ATP-bindende Kassette (*ATP binding cassette*)
A. fumigatus	*Aspergillus fumigatus*
A. nidulans	*Aspergillus nidulans*
A. niger	*Aspergillus niger*
Ant	Anthranilsäure
A. ochraceus	*Aspergillus ochraceus*
A. oryzae	*Aspergillus oryzae*
A. parasiticus	*Aspergillus parasiticus*
A. variecolor	*Aspergillus variecolor*
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AQ	Asterrichinon (*asterriquinone*)
AS	Aminosäure
ATCC	*American Type Culture Collection*
A. terreus	*Aspergillus terreus*
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	Brustkrebs-Resistenz-Protein (*breast cancer resistance protein*)
bidest.	bidestiliert
BLAST	*Basic Local Alignment Search Tool*
bp	Basenpaar
br s	breites Singulett
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CAPS	3-(Cyclohexylamino)propansulfonsäure
CAS	*Chemical Abstracts Service*
CBS	*Centraalbureau voor Schimmelcultures*
CD	Circulardichroismus
cDNA	komplementäre DNA (*complementary DNA*)
C. globosum	*Chaetomium globosum*
COSY	*Correlation spectroscopy*
d	Dublett
Da	Dalton
DAD	Diodenarraydetektor
dd	Dublett vom Dublett
DDAQ D	Didemethylasterrichinon D
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dem.	demineralisiert
DMAPP	Dimethylallyldiphosphat
DMATS	Dimethylallyltryptophansynthase
DMF	N,N'-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMSPP	Dimethylallyl-S-thiolodiphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure (*deoxyribonucleic acid*)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA

DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dT	Desoxythymidin
DTT	1,4-Dithiothreitol
E. coli	*Escherichia coli*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (*ethylenediaminetetraacetic acid*)
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*)
EI	Elektronenstoßionisation
ESI	Elektrosprayionisation
et al.	und andere (*et alii*)
FGSC	*Fungal Genetic Stocks Center*
5-FOA	5-Fluororotsäure (*5-fluoroorotic acid*)
FPLC	*fast protein liquid chromatography*
FPP	Farnesyldiphosphat
5-FU	5-Fluoruracil
G	Guanin
g	Schwerebeschleunigung
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure (*genomic deoxyribo-nucleic acid*)
GGPP	Geranylgeranyldiphosphat
GMM	Glucoseminimalmedium
gpdA	Glyceraldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GPP	Geranyldiphosphat
GST	Glutathione S-transferase
GTPase	Guaninnucleotid-bindendes Protein
h	Stunde
His_6	Hexahistidin
His_8	Octahistidin
HMBC	*Heteronuclear multiple-bond correlation*
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
HPLC	*high performance liquid chromatography*
HR-MS	Hochaufgelöste Massenspektrometrie (*high resolution mass spectrometry*)
HSQC	*Heteronuclear single-quantum coherence*
IAM	*Institute of Applied Microbiology (University of Tokyo)*
IB	Einschlusskörper (*inclusion bodies*)
IBT	*Culture Collection of Fungi (Technical University of Denmark)*
ID	Bezeichnung (*identifier*)
IPP	Isopentenyldiphosphat
IPPS	Isoprenyldiphosphatsynthase
IPTG	Isopropyl-β-Thiogalactosid
J	Kopplungskonstante
kb	Kilobasen
k_{cat}	Wechselzahl
k_{cat}/K_M	katalytische Effizienz
K_M	Michaelis-Konstante
LB	Lysogeny Broth
m	Multiplett
M	Molarität (mol/l)
M. aurantiaca	*Malbranchea aurantiaca*
Mb	Megabasenpaare
MCS	Multiple Klonierungsstelle (*multiple cloning site*)
min	Minute
mRNA	Boten-RNA (*messenger RNA*)
MS	Massenspektrometrie
mult.	Multiplizität

MWCO	Molekülmassenausschlussgrenze (*Molecular Weight Cut Off*)
m/z	Masse-zu-Ladung-Verhältnis
N	Normalität (Äquivalentkonzentration)
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
N. fischeri	*Neosartorya fischeri*
NIH	*National Institute of Health*
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NOE	Kern-Overhauser-Effekt (*nuclear Overhauser effect*)
NOESY	*Nuclear overhauser enhancement spectroscopy*
NRP	Nichtribosomales Peptid
NRPS	Nichtribosomale Peptidsynthetase
NRRL	*Northern Regional Research Laboratory (ARS Culture Collection)*
OD	Optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (*open reading frame*)
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung (*phosphate buffered saline*)
PCP	*Peptidyl Carrier Protein*
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*)
PDB	*Protein Data Bank*
PKS	Polyketidsynthase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP_i	Diphosphatanion
PT/PTase	Prenyltransferase
PTP1B	Proteintyrosinphosphatase 1B
RP	Umkehrphase (*reversed phase*)
rpm	Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*)
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
s	Singulett
SAH	*S*-Adenosylhomocystein
SAM	*S*-Adenosylmethionin
SAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase
S. cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumlaurylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*)
t	Triplett
T	Thymin
TB	Terrific Broth
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*)
TIM	Triosephosphatisomerase
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Trk	Tropomyocinrezeptorkinase
t sept	Triplett vom Septett
UV	Ultraviolett
v	Volumen
Vol.	Volumen
w	Masse (*weight*)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid

Zusammenfassung

Um ihr eigenes Überleben zu sichern und sich Vorteile gegenüber anderen Bewohnern ihrer Umwelt zu verschaffen, haben Mikroorganismen die Fähigkeit entwickelt, bioaktive Sekundärmetabolite zu produzieren. Diese kann sich der Mensch als Antibiotika, Immunsuppressiva oder als Leitsubstanzen für die Entwicklung neuer Wirkstoffe wie HIV-Proteaseinhibitoren oder Insulinmimetika ebenfalls zu Nutze machen. Damit stellen sie eine wichtige Quelle potentiell nutzbarer Wirkstoffe dar. Große Fortschritte wurden in den vergangenen Jahrzehnten auf dem Gebiet der Erforschung der für die Biosynthese dieser Metabolite notwendigen mikrobiellen Werkzeuge gemacht. Einerseits sind nichtribosomale Peptidsynthetasen und Polyketidsynthasen weit verbreitete Enzyme, die in viele Biosynthesen von Grundstrukturen involviert sind und aufgrund ihrer modularen Struktur viel Spielraum für Manipulationen durch die Synthetische Biologie bieten. Andererseits können Sekundärmetabolite durch Modifikationsenzyme (*tailoring enzymes*) wie z. B. Prenyltransferasen weiter verarbeitet werden, was ihre biologische Aktivität häufig erhöht. Um diese Enzyme gezielt einsetzen zu können, ist es von essentieller Bedeutung, ihre Struktur und Funktion zu untersuchen und zu verstehen.

Zahlreiche prenylierte Bisindolylbenzochinone aus der Gruppe der prenylierten Indolalkaloide konnten bereits aus Ascomyceten isoliert werden, biochemische Informationen waren bisher allerdings nur für die Biosynthese von Terrechinon A in *Aspergillus nidulans* verfügbar. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnten die putativen Prenyltransferasegene *astPT* und *ATEG_00702* (EAU39348) aus *Aspergillus terreus* heterolog in *Escherichia coli* exprimiert und anschließend bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Das rekombinante Protein AstPT katalysierte in Anwesenheit von Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) die *N*- und *C*-Prenylierung von Asterrichinon D (AQ D). Als enzymatische Produkte konnten zwei mono- und zwei diprenylierte Substanzen isoliert werden, deren Strukturen mittels NMR-Spektroskopie und Massenspektrometrie aufgeklärt wurden. Wie andere Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie war AstPT in seiner Katalyse unabhängig von Metallionen und folgte der Michaelis-Menten-Kinetik mit einer Michaelis-Konstante von 463 µM und einer Wechselzahl von 0,16 s^{-1} für AQ D bzw. von 33,5 µM und 0,02 s^{-1} für DMAPP. Besonderheiten von AstPT sind die Einführung von Prenyleinheiten an zwei verschiedenen Positionen des Substrates und zum anderen die hohe Spezifität für seine aromatischen Substrate. AstPT akzeptierte weder Aminosäuren noch cyclische Dipeptide, wie sonst typisch für Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie. Hingegen akzeptierte sie vier Hydroxyxanthonderivate als Substrate und katalysierte *O*-Prenylierungen in Anwesenheit von DMAPP, Geranyl- (GPP) und Farnesyldiphosphat (FPP), was bisher nur für ein Enzym der DMATS-Superfamilie beobachtet werden konnte. Die Michaelis-Konstante

für das beste Xanthonderivat wurde mit 17,3 µM bestimmt, allerdings war die Wechselzahl für AQ D um das 160-fache höher als für das Xanthonderivat. EAU39348 konnte AQ D nicht umsetzen, mit Didemethylasterrichinon D (DDAQ D) als aromatisches Substrat war hingegen die Bildung von mehreren Produkten zu beobachten. Die langsame Umsetzung von AQ D durch AstPT und die alleinige Umsetzung von DDAQ D durch EAU39348 deuten auf eine bevorzugte Produktion von DDAQ D-Derivaten in *Aspergillus terreus* hin, die in deren höherer Bioaktivität begründet sein könnte.

Ein drittes putatives Prenyltransferasegen, *CHGG_03684*, konnte aus *Chaetomium globosum* kloniert und in verschiedenen Expressionssystemen getestet werden. Unter diesen Bedingungen konnte jedoch kein lösliches Protein erhalten werden. Nach Solubilisierung der Protein-Einschlusskörper mittels Harnstoff wurde eine Renaturierung durch Dialyse versucht. Mit dem erhaltenen Protein und AQ D konnte in Anwesenheit von DMAPP keine Umsetzung beobachtet werden.

Des Weiteren wurden vier putative, NRPS-ähnliche Gene aus *Aspergillus terreus* bzw. *Chaetomium globosum* mittels PCR amplifiziert. *ATEG_02004*, *ATEG_03563* und *CHGG_03687* konnten in den Expressionsvektor pJW24 kloniert werden, der *pyrG* als Selektionsmarker für die anschließende Transformation trägt. Das Konstrukt mit *ATEG_02004* konnte erfolgreich in *Aspergillus niger* AB 1.13 eingebracht und die Integration in Genom mittels PCR nachgewiesen werden. Die Untersuchung der Sekundärmetabolit-produktion der Transformanten führte allerdings nicht zur Identifizierung der Funktion von *ATEG_02004*.

In einem weiteren Projekt innerhalb dieser Arbeit wurde die Bedeutung verschiedener Aminosäuren in FtmPT1 untersucht, um den auf der Enzymstruktur basierten Reaktions-mechanismus zu bestätigen. Durch zielgerichtete Mutagenese mittels PCR und anschließende Überproduktion und Aktivitätstests konnte die Beteiligung des Glutamatrests 102 an der Stabilisierung des Indolstickstoffs über Wasserstoffbrückenbindungen und seine Rolle als Protonenakzeptor während der Katalyse gezeigt werden. Der Austausch von Glycin 115 führte zur Änderung der Prenylierungsposition von C-2 nach C-3 unter Entstehung eines Hexahydropyrroloindols. Dies konnte sowohl für das natürliche Substrat von FtmPT1, Brevianamid F, als auch für verschiedene cyclische Dipeptide nachgewiesen werden. Damit wurde die essentielle Rolle von G115 in der Prenylierung in FtmPT1 aufgezeigt. Mutationen der entsprechenden Aminosäure in CdpC3PT, A115, senkten nur die Aktivität. Mit dem Austausch von Tyrosin 205 gegen Phenylalanin konnte die Akzeptanz von sechs Hydroxy-naphthalinderivaten gegenüber dem Wildtypprotein verbessert werden.

Summary

Microorganisms developed the capability to produce bioactive secondary metabolites to ensure their own viability and get evolutionary advantages. These metabolites can be used as antibiotics or immunosuppressive drugs, but also as lead structures for the development of new drugs like HIV protease inhibitors or insulin mimetics. Therefore, microorganisms are an important source of potentially active pharmaceutical ingredients. Significant progress has been achieved in the past decades in the research on the biosynthesis of these compounds. On the one hand, nonribosomal peptide synthetases and polyketide synthases are common enzymes involved in the biosynthesis of the backbones of numerous metabolites and their module-based structure represents a target for manipulations with the means of synthetic biology. On the other hand, secondary metabolites can be further modified by tailoring enzymes like prenyltransferases which often leads to a higher biological activity. It is of particular importance to investigate these structures and to understand their functions in order to make use of those enzymes.

Many prenylated bisindolylbenzoquinones belonging to prenylated indole alkaloids have been isolated from ascomycetes, but biochemical information has been available only for the biosynthesis of terrequinone A in *Aspergillus nidulans* prior to this thesis. In this thesis the putative prenyltransferase genes *astPT* and *ATEG_00702* (EAU39348) from *Aspergillus terreus* were expressed heterologously in *Escherichia coli* and subsequently purified to near homogeneity. The recombinant protein AstPT catalysed the *N*- and *C*-prenylation of asterriquinone D in the presence of dimethylallyldiphosphate (DMAPP). The enzyme products, two mono- and two diprenylated compounds, were isolated and their structure was elucidated by NMR spectroscopy and mass spectrometry. As other prenyltransferases from the DMATS-superfamily, AstPT was not dependent on the presence of metal ions for its catalytic activity. The reaction apparently followed Michaelis-Menten kinetics and the Michaelis constant was determined at 463 µM with a turnover number at 0.16 s^{-1} for AQ D and at 33.5 µM and 0.02 s^{-1} for DMAPP, respectively. Special features of AstPT were the introduction of prenyl moieties at two distinct sites of the substrate and its high specificity towards its aromatic substrate. It accepted neither amino acids nor cyclic dipeptides, which are typical substrates of prenyltransferases of the DMATS-superfamily. However, it accepted four hydroxyxanthone derivatives as substrates and catalysed *O*-prenylations in the presence of DMAPP but also from geranyl- (GPP) and farnesyldiphosphate (FPP). This phenomenon has only been observed for one enzyme from this group before. The best accepted xanthone derivative had a Michaelis constant at 17.3 µM, but the turnover number for AQ D was 160 times higher than for this hydroxyxanthone. EAU39348 was not able to convert AQ D. Using didemethylasterriquinone D (DDAQ D) as aromatic substrate, the

formation of several products was observed. The slow conversion of AQ D by AstPT and the exclusive acceptance of DDAQ D by EAU39348 may indicate that the production of DDAQ D derivatives is preferred in *Aspergillus terreus*. The reason for this might be the stronger biological activities of DDAQ D derivatives in comparison to AQ D derivatives.

A third putative prenyltransferase gene, *CHGG_03684*, was cloned from *Chaetomium globosum* and overproduction was tested in different expression systems. Unfortunately, no soluble protein was obtained under these conditions. An attempt of renaturation *via* dialysis was made after solubilisation of inclusion bodies with urea, but no activity was observable after incubation with AQ D and DMAPP.

Furthermore, four putative NRPS-like genes from *Aspergillus terreus* and *Chaetomium globosum* were amplified *via* PCR. *ATEG_02004*, *ATEG_03563* and *CHGG_03687* were cloned into the expression vector pJW24 containing *pyrG* as a selection marker for subsequent transformations. The construct with *ATEG_02004* was successfully trans-ferred into *Aspergillus niger* AB 1.13 and the genomic integration was confirmed *via* PCR. The function of *ATEG_02004* could not be identified by investigation of the produced secondary metabolites.

In addition, the importance of several amino acid residues in FtmPT1 was studied in this thesis to support the proposed reaction mechanism, which is based on the enzyme structure. The involvement of glutamate 102 in the stabilization of the indole nitrogen and its role as proton acceptor during catalysis was shown in activity assays after site-directed mutagenesis and overproduction of the proteins. Exchange of glycine 115 for threonine led to a shift of the prenylation position from C-2 to C-3 and the introduction of a hexahydropyrroloindole. This was observed by using the natural substrate brevianamide F as well as different cyclic dipeptides. These results revealed the essential role of G115 in the prenylation of FtmPT1. Mutation of the corresponding amino acid in CdpC3PT did not have any effect on the prenylation position and simply decreased the activity. The exchange of tyrosine 205 for phenylalanine increased the acceptance of six hydroxynaphthaline derivatives.

1. Einleitung

1.1. Ascomycota

1.1.1. Allgemeines

Die Ascomycota (Schlauchpilze) stellen die mit über 60.000 beschriebenen Arten größte und im medizinischen und technologischen Kontext eine der wichtigsten Abteilungen innerhalb der Pilze dar (Kirk *et al.,* 2008). Die Gesamtzahl aller Arten wird auf 70.000 bis 300.000 geschätzt (Hawksworth 2001). Ascomyceten können saprotroph, als Parasiten biotroph oder nekrotroph oder als Symbionten in Form von Flechten und Mykorrhizapilzen leben. Alle Schlauchpilze sind Hyphenpilze und können in Abhängigkeit von der Form ihrer Fortpflanzung in sexuelle (teleomorphe) und asexuelle (anamorphe) Stadien unterteilt werden. Von vielen Arten ist ein sexuelles Stadium (zumindest derzeit) nicht bekannt, sie wurden daher früher als Deuteromycetes oder *Fungi imperfecti* einer eigenen Abteilung zugeteilt. Zudem unterscheiden sich Teleomorphe und Anamorphe derart, dass eine Zuordnung von beiden Stadien zu einer Art nicht möglich war, so dass beide Stadien auch teilweise verschiedenen Arten oder Gattungen zugeordnet wurden und deshalb unterschiedliche Namen tragen. Erst durch molekulargenetische Analysen können beide Stadien zweifelsfrei einander zugeordnet werden.

Schlauchpilze weisen das gemeinsame Merkmal der Bildung von Ascosporen in Schläuchen (Asci) während der sexuellen Phase auf (Kück *et al.,* 2009). Dabei bilden viele von ihnen Fruchtkörper (Ascokarp oder Ascoma), in denen sich die Asci befinden und die als Apothecien, Kleistothecien oder Perithecien ausgebildet sein können oder aber die Asci liegen nackt vor. Häufiger werden jedoch im asexuellen Stadium die vegetativen Konidiosporen durch mitotische Teilung gebildet (Kück *et al.,* 2009). Verbreitet werden die Sporen hauptsächlich über die Luft, daher sind sie häufig zum Zwecke des UV-Schutzes pigmentiert.

Die Einteilung innerhalb der Ascomycota wird in drei Unterabteilungen gegliedert: die Taphrinomycotina (mit fünf Klassen), die Saccharomycotina (mit der Ordnung der Echten Hefen) und die Pezizomycotina (Echte Schlauchpilze), hiervon enthalten Letztere die meisten Klassen, wozu auch die Gattungen *Aspergillus* und *Chaetomium* gehören (Hibbett *et al.,* 2007). Als Schimmelpilze werden gemeinhin Arten verschiedener pilzlicher Abteilungen bezeichnet, die sich durch filamentöses Wachstum, saprotrophe Lebensweise und die Bildung vegetativer Sporen auszeichnen.

Schlauchpilze stellen für viele Industriezweige relevante Enzyme her, die zum Abbau von Stärke und Cellulose oder zur Herstellung von Kohlenhydraten, Aminosäuren und Lebensmitteln eingesetzt werden (Kück *et al.,* 2009), oder sie dienen der rekombinanten Herstellung eben solcher Enzyme (Meyer 2008). In der Biotechnologie dienen Schlauchpilze der Produktion von organischen Säuren wie Ascorbinsäure (*Aspergillus* sp.) oder Zitronen-

säure (*Aspergillus niger*) (Archer *et al.,* 2008), der Produktion von Steroiden durch Biotransformationsverfahren oder von Antibiotika (z. B. β-Lactame durch *Penicillium chrysogenum*) und Immunsuppressiva (Mycophenolsäure aus *Penicillium* sp., Ciclosporin aus *Tolypocladium inflatum*) (Kück *et al.,* 2009). So konnte etwa Compactin aus *Penicillium citrinum* isoliert werden und wurde unter der Bezeichnung Mevastatin (ML-236B) aufgrund seiner 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-(HMG-CoA)-Reduktase-hemmenden Eigenschaften (Endo *et al.,* 1976) Leitsubstanz für die Entwicklung der lipidsenkenden Statine.

Auch in der Lebensmitteltechnologie spielen Ascomycota eine große Rolle. So dient die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* schon seit jeher der Produktion von Brot, Bier und Wein, darüber hinaus können sich fermentierte Lebensmittel durch längere Haltbarkeit, zusätzliche Aromastoffe und bessere Bekömmlichkeit auszeichnen, wie beispielweise Salami (*Penicillium* sp.), Blauschimmelkäse (*Penicillium roqueforti*), Weißschimmelkäse (*Penicillium camemberti*) oder Sojasauce (*Aspergillus oryzae*, *Aspergillus sojae*) (Kück *et al.,* 2009).

Für die Grundlagenforschung ist besonders *Aspergillus nidulans* relevant, der seit Jahren als Modellorganismus zur Untersuchung des Zellzyklus und der Anwendung von molekularbiologischen Methoden dient (Osmani & Mirabito 2004).

Als Pathogene sind am Menschen vor allem die keratinverwertenden Dermatophyten (*Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis*, *Epidermophyton floccosum*) als Erreger der Dermatomykosen (*Tinea*) oder *Candida albicans* in Form von Haut- und Schleimhautinfektionen relevant (Hof *et al.,* 2009). Unter den Schimmelpilzen hat *Aspergillus fumigatus* die größte Bedeutung und vermehrt sich auf vorgeschädigter Haut (z. B. in Form einer *Otitis externa*[1]) und kann nach Inhalation in immunkompromittierten Personen zu einem Lungen-Aspergillom, Pneumonien oder einer invasiven Aspergillose führen. *Penicillium marneffei* löst aufgrund von gebildeten Mykotoxinen hauptsächlich Allergien aus (Hof *et al.,* 2009). Bei *Pneumocystis jirovecii*, dem Erreger der Pneumocystispneumonie, handelt es sich nicht wie lange vermutet um ein Protozoon, sondern ebenfalls um einen Schlauchpilz (Stringer *et al.,* 2002).

1.1.2. Die Gattungen *Aspergillus* und *Chaetomium*

Die Gattung *Aspergillus* gehört zur Familie der Trichocomaceae innerhalb der Ordnung der Eurotiales und der Klasse der Eurotiomycetes (Geiser *et al.,* 2006), deren Vertreter aufgrund der Form ihrer Konidienträger auch Gießkannenschimmel genannt werden. Diese stehen aufrecht am Mycel ab und enden in einem Vesikel, auf dem Phialiden (uniseriat) oder Metulae mit Bündeln von Phialiden (biseriat) sitzen, an denen die Konidien durch Abschnürung gebildet werden (Kück *et al.,* 2009). Derzeit sind etwa 250 *Aspergillus*-

[1] Entzündung des äußeren Ohres und des äußeren Gehörgangs.

Arten bekannt, von denen 64% keinem bekannten Teleomorph zuzuordnen sind (Dyer & O'Gorman 2011).

Die Gattung *Chaetomium* gehört seit ihrer Einführung 1817 durch Kunze zur Familie der Chaetomiaceae innerhalb der Ordnung der Sordariales (Sordariomycetes) (Zhang *et al.,* 2006). Die saprotrophe Gattung ist hauptsächlich aufgrund ihrer cellulolytischer Eigenschaften für den Abbau von Papier und Stoffen von Bedeutung (Zhang *et al.,* 2006). *Chaetomium* kommt hauptsächlich in Böden gemäßigter bis tropischer Regionen vor. Mehr als 350 verschiedene Arten sind bekannt, aus denen über 200 bioaktive Sekundärmetabolite isoliert werden konnten (Zhang *et al.,* 2012). *Chaetomium* zeichnet sich durch die Bildung von Fruchtkörpern in Form von rundlichen Perithecien aus, die zahlreiche, gerade oder spiralförmige, dunkle Haare (Setae) um die Ostiole tragen (Webster 1980). Die Ostiole ist eine Pore an der Oberseite des Peritheciums und dient der Freisetzung der meist zitronenförmigen Ascosporen, die in keulenförmigen Asci reifen.

1.1.2.1. Aspergillus terreus

Aspergillus terreus (*A. terreus*) wurde zum ersten Mal 1918 wissenschaftlich beschrieben (Thom & Church 1918). Der Pilz kommt hauptsächlich in wärmeren Regionen vor und wird vor allem im Boden und auf verrottendem Pflanzenmaterial gefunden. Kolonien besitzen makroskopisch sichtbar nach starker Konidienbildung eine beige bis zimtbraune Färbung (Abbildung 1-1, A), was sie bereits von anderen *Aspergillus*-Arten unterscheidet, während das Mycel weiß und die Unterseite gelb bis braun erscheinen. Mikroskopisch sind die biseriaten Konidienträger zu erkennen (Abbildung 1-1, B), die bis zu 500 µm lang werden und Vesikel mit einem Durchmesser von 30-50 µm tragen. Die Metulae und Phialiden sind in etwa gleich lang. Die Konidien sind rundlich und erscheinen hyalin bis gelblich. Eine Besonderheit ist die Ausbildung von hyalinen Aleurosporen in Submerskulturen, die direkt an den Hyphen gebildet werden (Abbildung 1-1, C).

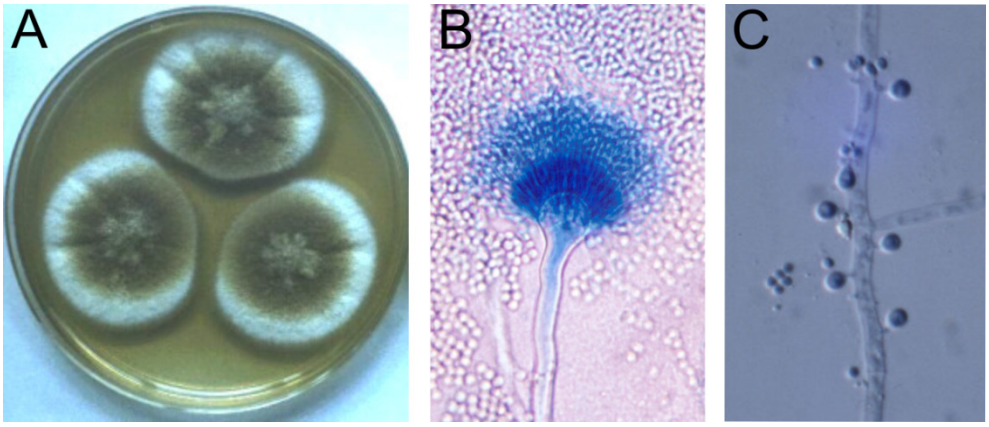


Abbildung 1-1: Kultur (A) und mikroskopische Bilder eines Konidienträgers (B) bzw. von Aleurosporen (C) von *A. terreus*. Aus: http://www.asperweb.co.uk/images/species, abgerufen am 13.05.2014.

Der Pilz wächst im Temperaturbereich von 11 bis 48 °C, wobei das Optimum bei 35 bis 40 °C liegt (Domsch *et al.,* 2007). Er ist im Stande, Stärke, Pektin, Tannin, Cellulose, Arabinoxylan, Carboxymethylcellulose, Keratin und Wolle abzubauen (Domsch *et al.,* 2007). Lange war eine sexuelle Vermehrungsweise von *A. terreus* nicht bekannt, konnte aber 2013 nachgewiesen werden (Arabatzis & Velegraki 2013). Sporen können die Passage des menschlichen Gastrointestinaltrakts überleben, ähnliche Versuche mit Kaninchen verliefen tödlich (Thom & Church 1918).

Das Genom konnte 2006 durch das *Broad Institute* (Cambridge, MA, USA) sequenziert und annotiert werden. Es besteht aus 29,33 Mb verteilt auf acht Chromosomen und enthält wahrscheinlich 10.406 proteinkodierende Gene[2].

A. terreus ist ein seltener Erreger opportunistischer Infektionen, nur etwa 3 bis 12,5% der invasiven Aspergillosen werden durch ihn verursacht (Steinbach *et al.,* 2004). Aufgrund seiner Resistenz gegenüber Amphotericin B (Sutton *et al.,* 1999), das als Standardtherapie bei Aspergillosen eingesetzt wird, weisen Infektionen mit *A. terreus* allerdings häufiger tödliche Verläufe auf als bei anderen *Aspergillus*-Arten. Für industrielle Anwendungen von

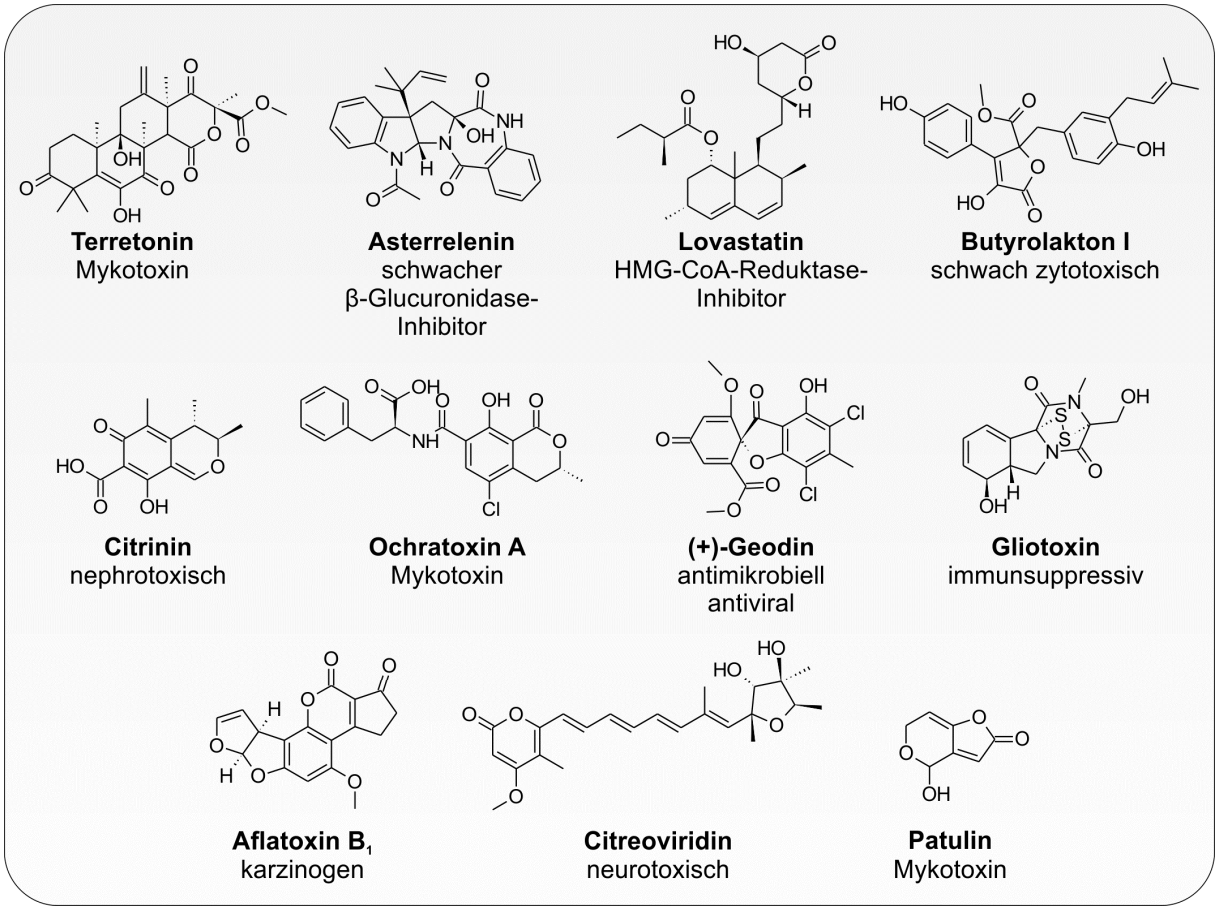


Abbildung 1-2: Ausgewählte Sekundärmetabolite aus *A. terreus*.

[2] http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/aspergillus_group/GenomeStats.html, abgerufen am 13.05.2014.

Bedeutung ist der Pilz wegen seiner Produktion des HMG-CoA-Reduktasehemmers Lovastatin (Mevinolin) (Abbildung 1-2) (Alberts *et al.,* 1980), von Itaconsäure, einem Baustein in der Polymerchemie (Klement & Büchs 2013) und von Xylanase, die in der Papierindustrie zum chlorfreien Bleichen verwendet wird (de Souza Moreira *et al.,* 2013). Daneben produziert *A. terreus* eine Reihe von Sekundärmetaboliten wie den Bisindolyl-benzochinonen (s. Kapitel 1.4.2), antibiotisch wirksamen Substanzen und Mykotoxinen wie Patulin (Wilson 1976), Citrinin, (+)-Geodin (Boruta & Bizukojc 2014), Gliotoxin (Kupfahl *et al.,* 2008), Aflatoxine, Ochratoxin A (Atalla *et al.,* 2003), Isoterrin, Territrem A (Ling *et al.,* 1979), Citreoviridin (Franck & Gehrken 1980), Asterrelenin, Butyrolakton I, Terretonin (Guo *et al.,* 2012) (Abbildung 1-2). Für einige Aspulvinone aus *A. terreus* konnte kürzlich eine antivirale Wirkung gegenüber dem Influenza A H1N1-Virus beobachtet werden (Gao *et al.,* 2013).

1.1.2.2. Chaetomium globosum

Chaetomium globosum (*C. globosum*) (Kunze ex Fries) wurde 1829 von Fries beschrieben. Seine Kolonien sind anfangs weiß und färben sich später braun bis graubraun. Der Pilz bildet oberflächliche, braune bis schwarze Perithecien, die mit zahlreichen unverzweigten Haaren besetzt sind und durch rhizoide Hyphen mit dem Substrat verbunden sind (Abbildung 1-3, A). Die rhizoiden Hyphen sind glattwandig, dagegen weisen die Haare „saugknopfartige Wanderhebungen“ auf (Abbildung 1-3, C) (Parameswaran & Liese 1972). Die Ascosporen sind braun und zitronenförmig (Abbildung 1-3, B). *C. globosum* wächst bei pH-Werten von 4,3 bis 9,4, wobei das Optimum für das Wachstum und die Mykotoxin-produktion bei neutralen pH-Werten liegt, während Perithecien und Ascosporen bevorzugt bei sauren pH-Werten gebildet werden (Fogle *et al.,* 2007). Das anamorphe Stadium bildet uniseriate Konidienträger (Webster 1980).

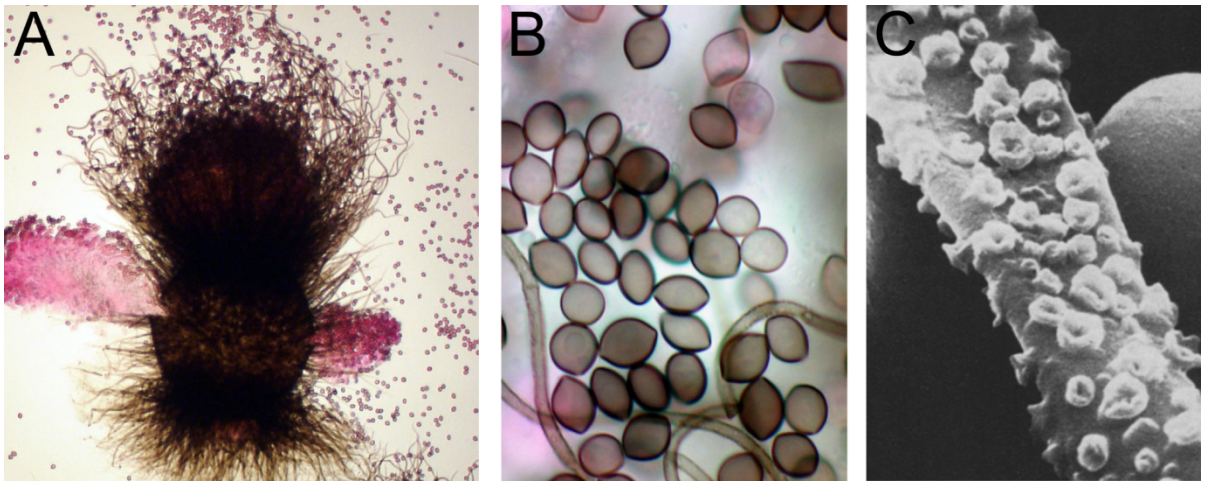


Abbildung 1-3: Mikroskopische Aufnahmen von *C. globosum*. A: Perithecium mit basalen rhizoiden Hyphen, leicht spiralförmigen Haaren auf der Oberseite und ausgetretenen Ascosporen (Lactofuchsin-Färbung). B: Zitronenförmige Ascosporen (Lactofuchsin-Färbung). A+B modifiziert (Originalaufnahmen unter http://fungi.myspecies.info/taxonomy/term/4032/media, abgerufen am 15.05.2014). C: Haare mit Wanderhebungen (modifiziert nach Parameswaran & Liese 1972).

Das Genom wurde 2004 durch das *Broad Institute* sequenziert und 2005 annotiert. Es besteht aus 34,89 Mb und enthält 11.124 proteinkodierende Gene[3].

Infektionen mit *Chaetomium* sind selten, *C. globosum* tritt dabei aber als häufigster Erreger auf. Beschrieben sind Phäohyphomykosen[4] und systemische Infektionen in immunkompromittierten Patienten sowie Onychomykosen[5] in gesunden Personen (Kim *et al.,* 2013). *C. globosum* tritt häufig nach Wasserschäden in Gebäuden auf (Andersen *et al.,* 2011) und wird mit Allergien und dem *Sick Building Syndrome* in Verbindung gebracht, das durch ausgedünstete Chemikalien aber auch Mykotoxine und Pilzsporen ausgelöst werden kann (Straus 2011).

Der Pilz ist vor allem für die Produktion von Sekundärmetaboliten wie dem antibiotisch wirksamen Cochliodinol (Brewer *et al.,* 1968; Brewer *et al.,* 1984), den zytotoxischen Chaetoglobosinen und Cytochalasinen (Umeda *et al.,* 1975), dem Chetomin, für das eine Hemmung des Hypoxie-induzierten Faktors 1 (HIF-1) beschrieben wurde, der einen wichtigen Einfluss auf das Überleben solider Tumoren hat (Brewer *et al.,* 1972; Staab *et al.,* 2007), den Chaetoviridinen, die gegen pflanzenpathogene Pilze wirken (Park *et al.,* 2005),

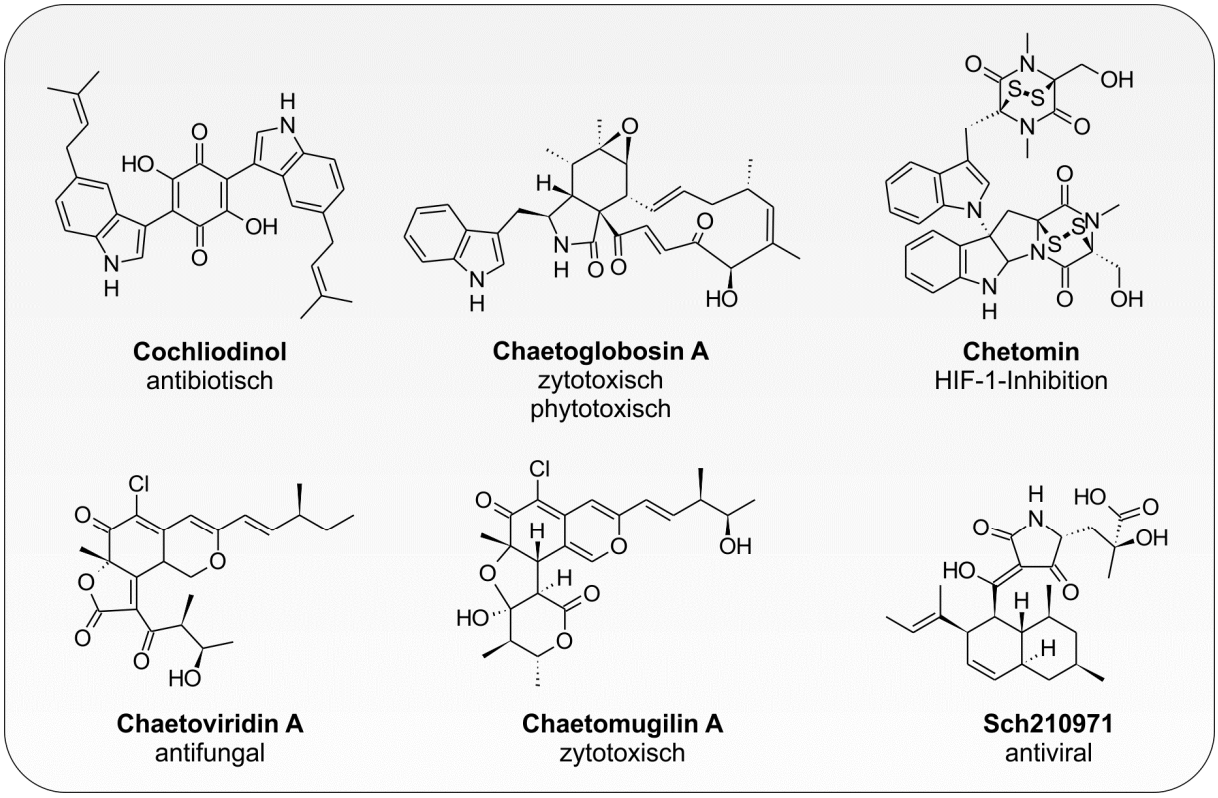


Abbildung 1-4: Ausgewählte Sekundärmetabolite aus *C. globosum*.

[3] http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/chaetomium_globosum.2/GenomeStats.html. Abgerufen am 15.05.2014.

[4] Infektionen der Haut und der Unterhaut, die durch pigmentierte Pilze ausgelöst werden, die Melanin ihren Zellwänden enthalten.

[5] Nagelpilz.

den Chaetomugilinen und den durch Chemokinrezeptor-CCR-5-Inhibition Anti-HIV-wirksamen Sch210971 und Sch210972 (Yang *et al.,* 2006) bekannt (Abbildung 1-4).

1.2. Prenyltransferasen

1.2.1. Allgemeines

Prenyltransferasen (PTasen) katalysieren die Übertragung von unterschiedlichen Isopreneinheiten auf eine Vielzahl von Substraten, nach denen sie in die folgenden drei Übergruppen unterteilt werden, die keinerlei Sequenzidentitäten untereinander aufweisen: (1) die Isoprenyldiphosphatsynthasen, (2) die Proteinprenyltransferasen und (3) die aromatischen Prenyltransferasen. Als Isopreneinheiten dienen dabei die beiden Isomere Isopentenyldiphosphat (IPP) und Dimethylallyldiphosphat (DMAPP) als C5-Bausteine oder deren Kondensationsprodukte Geranyldiphosphat (GPP, C10), Farnesyldiphosphat (FPP, C15) und Geranylgeranyldiphosphat (GGPP, C20). IPP und DMAPP stammen je nach Organismus aus dem Mevalonat- oder dem Methylerythritolphosphatweg und bilden die Grundlage für mehr als 60.000 unterschiedliche Isoprenoide aus pflanzlichen, pilzlichen, tierischen und mikrobiellen Quellen (Brandt *et al.,* 2009). Unabhängig vom Substrat beginnt jede Prenyltransferreaktion mit der Spaltung des Prenyldiphosphats, sodass ein reaktives Carbeniumion entsteht, welches im Anschluss elektrophil am zweiten Substrat angreift.

1.2.2. Isoprenyldiphosphatsynthasen

Isoprenyldiphosphatsynthasen (IPPS) sind verantwortlich für die Kondensation von FPP (C15) mit einzelnen Isopreneinheiten zu längeren Ketten und liefern damit die Bausteine für Terpenoide, Steroide, Retinoide und Carotinoide. Je nach Verknüpfung der Produkte werden *cis*- und *trans*-IPPS unterschieden (Ogura & Koyama 1998). Beide Gruppen unterscheiden sich nicht nur in der Konfiguration ihrer Produkte, sondern auch in ihrer Struktur. So bestehen beispielweise auf Aminosäureebene keine Identitäten zwischen den Sequenzen der beiden Gruppen und auch die dreidimensionalen Strukturen sind verschieden. *Trans*-IPPS weisen, als magnesiumabhängige Enzyme, zwei konservierte aspartatreiche (DDXXD) Bindemotive auf, die magnesiumvermittelt für die Koordinierung der Prenyldiphosphate verantwortlich sind. Die Produkte enthalten 20 bis 50 Kohlenstoffatome. Die Tertiärstruktur der *trans*-IPPS besteht vollständig aus α-Helices (Liang *et al.,* 2002).

In *cis*-IPPS dagegen sind zwar keine Magnesium-Bindemotive zu finden, sie sind aber dennoch magnesiumabhängig, weil die Diphosphate hier mittels Mg^{2+} über einzelne Aspartat- und Glutamatreste koordiniert werden (Pan *et al.,* 2000). Die Produkte enthalten 50 bis 120 Kohlenstoffatome und stellen wichtige Carrier für die Bausteine bakterieller

Zellwände dar. Die Tertiärstrukturen der *cis*-IPPS bestehen sowohl aus α-Helices, als auch aus β-Faltblättern (Guo *et al.,* 2005).

1.2.3. Proteinprenyltransferasen

Protein-PTasen führen posttranslationale Modifikationen an Proteinen durch und sind demzufolge nur in Eukaryoten vertreten. Prenylierungen sind dabei an Ras-, Rab- und anderen GTP-bindenden Proteinen und Proteinkinasen bekannt (Gelb *et al.,* 1998). Als Prenyldonoren dienen FPP und GGPP, die mit dem Schwefelatom eines Cysteins des Zielproteins verknüpft werden. Das zu prenylierende Cystein ist in verschiedenen C-terminalen Motiven wie „CaaX“ zu finden, wobei „a“ beliebige aliphatische Aminosäuren bezeichnet. Die Aminosäure an Position „X“ ist der determinierende Faktor, ob das Protein durch eine Farnesyltransferase (FTase) oder eine Geranylgeranyltransferase (GGTase) prenyliert wird (Zverina *et al.,* 2012). Beide Enzymgruppen sind Heterodimere, zinkabhängig und besitzen keine aspartatreichen Bindemotive. Proteine mit CaaX-Motiv werden durch die GGTase-I prenyliert, Rab-Proteine, die am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind, werden durch die GGTase-II prenyliert (Sinensky 2000). Diese besitzen cysteinhaltige Motive wie xxCC, xCxC oder CCxx und werden darin zweifach prenyliert (Farnsworth *et al.,* 1994). Zink wird dabei zur Aktivierung des Thiolats am Cystein benötigt, das als Nukleophil das Farnesyl- oder Geranylgeranylkation angreift (Liang *et al.,* 2002).

Nach erfolgter Prenylierung können Proteine in Biomembranen verankert werden und dienen dort der Signaltransduktion (Gelb *et al.,* 1998), andere werden von Endopeptidasen erkannt und die Aminosäuresequenz aaX wird vom C-Terminus entfernt. Diese Proteine sind dann einer weiteren Methylierung an der nun C-terminalen Carboxylgruppe des prenylierten Cysteins zugänglich. In Fall von Rab-Proteinen, die zwei Cysteinreste enthalten, kann im Anschluss an die Methylierung auch eine Verknüpfung des zweiten Cysteins mit Palmitat durchgeführt werden. Derartig prenylierte und lipidierte Proteine können verbessert in Membranen verankert werden, durch eine mögliche Abspaltung der Palmitoylgruppe ist aber auch ein erleichterter Transport gegeben (Gelb *et al.,* 2006).

1.2.4. Aromatische Prenyltransferasen

Aromatische PTasen katalysieren die Übertragung von Prenyleinheiten auf kleine, aromatische Akzeptormoleküle. Die Vielzahl an aromatischen Substraten geht auch mit einer großen Heterogenität der PTasen einher. So lassen sich membrangebundene, als auch lösliche Proteinen finden, außerdem Proteine, die in allen Organismen anzutreffen sind oder aber auf bestimmte Abteilungen beschränkt sind. Einige PTasen sind streng ionenabhängig, während andere auch in Abwesenheit von Kationen katalytisch aktiv sind. Als Prenyldonoren

finden hauptsächlich DMAPP, GPP und FPP Anwendung, in Pflanzen oder bei der Biosynthese von Ubichinonen können aber auch größere Ketten übertragen werden (Yazaki *et al.,* 2009). Bei allen Unterschieden hat die Prenylierung von aromatischen Grundkörpern eine große Relevanz für den produzierenden Organismus, da durch die Einführung von lipophilen Strukturen meist die biologische Aktivität der Substanzen stark erhöht wird (Usui *et al.,* 1998; Wollinsky *et al.,* 2012a), was durch eine verbesserte Interaktion mit Biomembranen und eine erhöhte Affinität zu möglichen Zielproteinen erklärt wird (Botta *et al.,* 2005a).

Wie bei allen PTasen beginnt die Reaktion mit der Abspaltung des Diphosphats, wodurch ein Prenylkation entsteht. Die positive Ladung kann zwischen den Positionen C-1 und C-3 delokalisiert sein, sodass bei den aromatischen PTasen reguläre als auch reverse Prenylierungen vorkommen (Abbildung 1-5), abhängig davon, welches Kohlenstoffatom nucleophil vom Aromaten angegriffen wird. Die Prenylierung kann dabei nicht nur an Kohlenstoff- oder Stickstoffatomen innerhalb des Aromaten stattfinden, sondern auch an aromatischen Sauerstoff- oder Schwefelfunktionen (Rudolf & Poulter 2013; Yu & Li 2012).

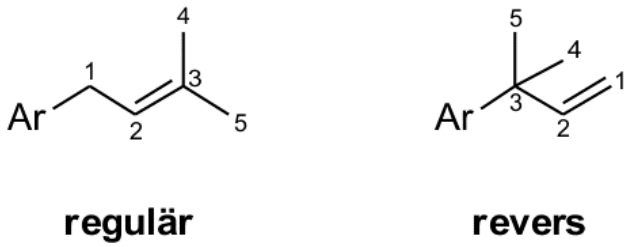


Abbildung 1-5: Reguläre und reverse Verknüpfung von Prenyleinheiten am Beispiel von DMAPP.
„Ar“ bezeichnet einen beliebigen aromatischen Rest.

1.2.4.1. PT-Barrel-Superfamilie

Diese Gruppe umfasst lösliche, pilzliche und bakterielle Enzyme, die aufgrund ihrer ähnlichen Tertiärstruktur zusammengefasst werden, dem sogenannten *prenyltransferase-barrel* (*PT-barrel*), die zuerst für NphB aufgeklärt werden konnte (Kuzuyama *et al.,* 2005).

1.2.4.1.1. CloQ/NphB-Gruppe

CloQ war der erste Vertreter dieser Gruppe, dessen Funktion aufgeklärt werden konnte. Es katalysiert die Übertragung eines Dimethylallylrest auf 4-Hydroxyphenylpyruvat in der Biosynthese des Aminocoumarinantibiotikums Clorobiocin in *Streptomyces roseo-chromogenes* (Pojer *et al.,* 2003). Es zeigte keine Ähnlichkeiten zu denjenigen PTasen, die zur damaligen Zeit bekannt waren und enthielt keine aspartatreichen Diphosphat-bindemotive. Auch war CloQ in seiner Aktivität nicht auf die Anwesenheit von zweiwertigen

Kationen angewiesen. Die gleiche Reaktion wird von NovQ aus *Streptomyces niveus* in der Biosynthese von Novobiocin durchgeführt (Ozaki *et al.,* 2009).

Daraufhin wurde mit NphB aus *Streptomyces* sp. eine PTase charakterisiert, die die Geranylierung eines 1,3,6,8-Tetrahydroxynaphthalinabkömmlings in der Biosynthese von Naphterpin und außerdem verschiedener Hydroxynaphthalinderivate, Flavonoide und Polyketide katalysiert (Kumano *et al.,* 2008; Kuzuyama *et al.,* 2005). NphB ist anders als CloQ Mg^{2+}-abhängig, weist aber dennoch keine aspartatreichen Bindemotive auf. Seine Struktur konnte 2005 aufgeklärt werden und enthüllte einen neuen Strukturtyp, das *PT-barrel*, bei dem zehn antiparallele β-Faltblätter einen lösungsmittelgefüllten Zylinder bilden, der von einem Ring von zum Lösungsmittel gerichteten α-Helices umgeben ist (Kuzuyama *et al.,* 2005). In der Sequenz von NphB wiederholen sich dabei fünf α-β-β-α-Elemente (Abbildung 1-6), weshalb auch die Bezeichnung der ABBA-PTasen existiert (Tello *et al.,* 2008). Die Koordinierung des Prenyldiphosphats wird durch ein Arginin, ein Asparagin, zwei Tyrosine und zwei Lysine gewährleistet, während das Mg^{2+}-Ion durch ein Lysin und zwei Aspartate koordiniert wird. Dieselbe *PT-barrel*-Faltung konnte später auch für CloQ gezeigt werden (Metzger *et al.,* 2010). Da hier Mg^{2+}-Ionen nicht an der Katalyse beteiligt sind, wird das Diphosphat durch ein Aspartat, zwei Arginine, drei Lysine und drei Tyrosine koordiniert.

Weitere Vertreter dieser Gruppe sind SCO7190 aus *Streptomyces coelicolor*, das ähnliche Reaktionen katalysiert wie NphB (Kumano *et al.,* 2008), Fnq26 aus der Biosynthese von Furanonaphthochinon I in *Streptomyces cinnamonensis* (Haagen *et al.*, 2006), Fur7 aus *Streptomyces* sp. (Kumano *et al.,* 2010), EpzP aus Streptomyces cinnamonensis (Seeger *et al.,* 2011) und PpzP aus *Streptomyces anulatus* (Saleh *et al.,* 2009a). Interessanterweise konnten drei verwandte Enzyme, Ptf_{At}, Ptf_{Ss} und Ptf_{Bf}, auch in den Ascomyceten *Aspergillus*

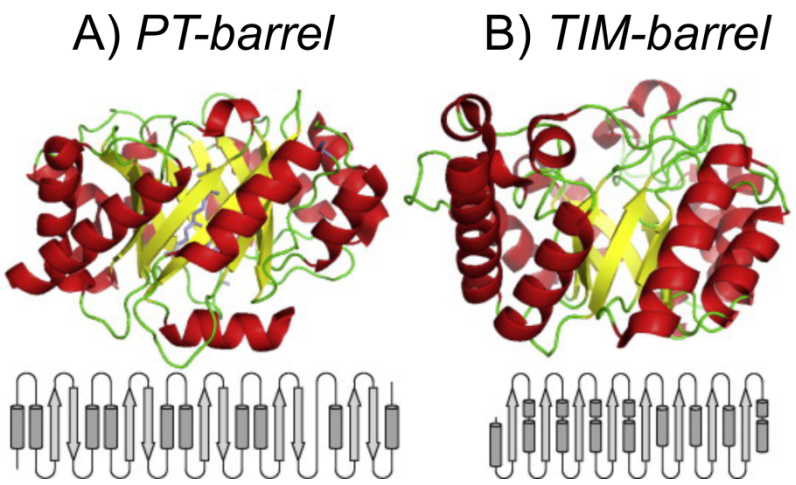


Abbildung 1-6: Vergleich der *PT-barrel*-Faltung der aromatischen PTasen (A) mit der *TIM-barrel*-Faltung (B), einem der am weitesten verbreiteten Strukturmuster (modifiziert nach Saleh *et al.,* 2009b). Stellvertretend sind die Strukturen von NphB aus *Streptomyces* sp. mit 10 antiparallelen β-Faltblättern (A) und einer Xylanase aus *Streptomyces lividans* mit 8 parallelen β-Faltblättern (B) dargestellt.

terreus, *Botryotinia fuckeliana* und *Sclerotinia sclerotiorum* identifiziert und biochemisch charakterisiert werden (Haug-Schifferdecker *et al.,* 2010).

1.2.4.1.2. DMATS-Superfamilie

Aromatische PTasen sind in Ascomyceten weit verbreitet und führen zu einem großen Spektrum an prenylierten Sekundärmetaboliten (Li 2010; Williams *et al.,* 2000). Da es sich bei vielen Substanzen um Mykotoxine oder potenzielle pharmazeutische Wirkstoffe handelt, besteht ein großes Interesse an der Aufklärung der Biosynthese. Im Jahre 1976 konnte die Aktivität der gereinigten Dimethylallylpyrophosphat:Tryptophandimethylallyl-transferase (DMAT-Synthetase) in *Claviceps* sp. beschrieben werden (Lee *et al.,* 1976), danach folgte im Jahre 1978 unter Verwendung von Fraktionen aus Enzymextrakten aus *A. terreus* die Beobachtung der Übertragung eines Dimethylallylrests auf die Butyrolaktonderivate Aspulvinon E und G (Takahashi *et al.,* 1978). Der erste Schritt in der molekularbiologischen Charakterisierung wurde mit der Entdeckung des kodierenden Genes für die 4-Dimethylallyltryptophansynthase (DMATS) DmaW innerhalb der Biosynthese von Ergotalkaloiden in *Claviceps fusiformis* gemacht (Tsai *et al.,* 1995). Unterstützt durch die zunehmende Verfügbarkeit genomischer Sequenzen (Jones 2007) folgten die Charakterisierungen zahlreicher homologer Enzyme, die die gemeinsamen Eigenschaften dieser PTasen aufzeigten. Es handelt sich um lösliche Proteine aus Ascomyceten, die in ihrer Reaktion stets unabhängig von der Anwesenheit von zweiwertigen Kationen sind und keine aspartatreichen Motive aufweisen. Hier bestehen also Ähnlichkeiten zu den PTasen der CloQ/NphB-Gruppe, da allerdings keine Sequenzhomologien zu finden sind, werden diese Enzyme zwei Untergruppen zugeordnet. Als aromatische Substrate akzeptieren die PTasen der DMATS-Superfamilie hauptsächlich einfache Derivate von L-Tryptophan oder L-Tryptophan-haltige cyclische Dipeptide (Tabelle 1-1), aber auch L-Tyrosin (Kremer & Li 2010), Indolderivate (Tabelle 1-1) und Xanthone (Pockrandt *et al.,* 2012) konnten als natürliche Substrate identifiziert werden.

Viele Enzyme zeichnen sich durch eine hohe Flexibiliät hinsichtlich ihrer aromatischen Substrate aus, während sie als Prenyldonor in den meisten Fällen ausschließlich DMAPP akzeptieren (Steffan *et al.,* 2009a). VrtC aus *Penicillium aethiopicum* ist ein Beispiel für die Übertragung eines Geranylrests auf tetrazyklische Naphthacendione (Chooi *et al.,* 2012). Doch auch für AnaPT konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym neben DMAPP auch GPP akzeptiert (Pockrandt & Li 2013). PAPT aus *Phomopsis amygdali* akzeptiert in der Biosynthese der Fusicoccine DMAPP und GPP und überträgt die Prenylreste sogar auf Glucoseeinheiten (Noike *et al.,* 2012). Mit BAE61387 aus *Aspergillus oryzae* konnte auch ein Enzym charakterisiert werden, das sowohl DMAPP als auch GPP und FPP in der Prenylierung von Hydroxynaphthalinen akzeptiert (Pockrandt *et al.,* 2014).

Teilweise kann sogar die Akzeptanz von unnatürlichen Diphosphaten beobachtet werden, wie für die Dimethylallylpyrophosphat:Aspulvinondimethylallyltransferase mit (*E*)-3-Methyl-2-pentenyldiphosphat oder Cyclopentylidenethyldiphosphat, die allerdings nur in Fraktionen von Enzymextrakten untersucht wurde (Takahashi *et al.,* 1978). Für die rekombinant hergestellten PTasen mit bekannter Sequenz, 5-DMATS, AnaPT, BrePT, CdpNPT, CdpC3PT, FgaPT2 und FtmPT1, konnte die Übertragung von Alkyleinheiten von 2-Pentenyldiphosphat und Methylallyldiphosphat auf aromatische Substrate beobachtet

Tabelle 1-1: Übersicht über die bereits biochemisch charakterisierten PTasen der DMATS-Superfamilie und deren natürliche Substrate.

Protein	Organismus	Aromatisches Substrat	Prenyldonor	Referenz
DmaW (AAC18893)	*Claviceps fusiformis* ATCC 26245	L-Tryptophan	DMAPP	(Tsai *et al.,* 1995)
FgaPT2 (AAX08549/3I4Z)	*Aspergillus fumigatus* AF293	L-Tryptophan	DMAPP	(Unsöld & Li 2005)
FtmPT1 (AAX56314/3O2K)	*Aspergillus fumigatus* AF293	*cyclo*-L-Trp-L-Pro	DMAPP	(Grundmann & Li 2005)
FgaPT1 (XP_756136)	*Aspergillus fumigatus* AF293	Fumigaclavin A	DMAPP	(Unsöld & Li 2006)
7-DMATS (ABS89001)	*Aspergillus fumigatus* B5233	L-Tryptophan	DMAPP	(Kremer *et al.,* 2007)
CdpNPT (ABR14712/4E0U)	*Aspergillus fumigatus* B5233	cyclische Dipeptide	DMAPP	(Yin *et al.,* 2007)
DmaW-Cs (AAZ29613)	IasaF13 (Clavicipitaceae)	L-Tryptophan	DMAPP	(Markert *et al.,* 2008)
TdiB (ABU51603)	*Aspergillus nidulans* RLMH37	DDAQ D	DMAPP	(Schneider *et al.,* 2008b)
FtmPT2 (EU622826)	*Aspergillus fumigatus* AF293	12,13-Dihydroxyfumitremorgin C	DMAPP	(Grundmann *et al.,* 2008)
MaPT (EU4200091)	*Malbranchea aurantiaca* RRC1813	L-Tryptophan	DMAPP	(Ding *et al.,* 2008)
AnaPT (EAW16181/4LD7)	*Neosartorya fischeri* NRRL181	(*R*)-Benzodiazepindion	DMAPP	(Yin *et al.,* 2009b)
CpaD-Ao (XP_001821505)	*Aspergillus oryzae* RIB40	*cyclo*-Acetoacetyl-L-tryptophan	DMAPP	(Liu & Walsh 2009)
CpaD-Af (XP_002379958)	*Aspergillus flavus* NRRL3357	*cyclo*-Acetoacetyl-L-tryptophan	DMAPP	(Liu & Walsh 2009)
CdpC3PT (EAW17508)	*Neosartorya fischeri* NRRL181	cyclische Dipeptide	DMAPP	(Yin *et al.,* 2010)
CTrpPT (GU722589)	*Aspergillus oryzae* DSM1147	cyclische Dipeptide	DMAPP	(Zou *et al.,* 2010)
NotC (ADM34131)	*Aspergillus* sp. MF297-2	6-Hydroxydesoxy-brevianamid E	DMAPP	(Ding *et al.,* 2010)
NotF (ADM34132)	*Aspergillus* sp. MF297-2	*cyclo*-L-Trp-L-Pro	DMAPP	(Ding *et al.,* 2010)
SirD (AAS92554)	*Leptosphaeria maculans*	L-Tyrosin	DMAPP	(Kremer & Li 2010)
5-DMATS (EAW08391)	*Aspergillus clavatus* NRRL1	L-Tryptophan	DMAPP	(Yu *et al.,* 2012)
FtmPT3 (EAW19377)	*Neosartorya fischeri* NRRL 181	Verruculogen	DMAPP	(Mundt *et al.,* 2012)
PAPT (BAL68129)	*Phomopsis amygdali* Niigata-2	Fusicoccin P	DMAPP, GPP	(Noike *et al.,* 2012)
VrtC (ADI24928)	*Penicillium aethiopicum* IBT 5753	Naphthacendione	GPP	(Chooi *et al.,* 2012)
Nf112230 (EAW20699) unter Bezeichnung **NscD**	*Neosartorya fischeri* NRRL 181	Naphthacendione Anthracenon	DMAPP	(Chooi *et al.,* 2012) (Chooi *et al.,* 2013)
Mc03599 (EEQ30780)	*Microsporum canis*	Naphthacendione	DMAPP	(Chooi *et al.,* 2012)
Tt06703 (EGD99349)	*Trichophyton tonsurans*	Naphthacendione	DMAPP	(Chooi *et al.,* 2012)
XptB (BN001302)	*Aspergillus nidulans* FGSC A4	1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-Hydroxymethylxanthon	DMAPP	(Pockrandt *et al.,* 2012)
ArdB	*Aspergillus fischeri*	Ardeemin FQ	DMAPP	(Haynes *et al.,* 2013)
BrePT (AFM09725)	*Aspergillus versicolor* NRRL 573	*cyclo*-L-Trp-L-Pro	DMAPP	(Yin *et al.,* 2013a)
CdpC2PT (EAW25546)	*Neosartorya fischeri* NRRL 181	*cyclo*-L-Trp-L-Pro	DMAPP	(Mundt & Li 2013)
BAE61387	*Aspergillus oryzae* DSM 1147	Hydroxynaphthaline	DMAPP, GPP, FPP	(Pockrandt *et al.,* 2014)

Angegeben ist der Proteinname mit NCBI-Zugriffsbezeichnung und die PDB-ID, falls eine Struktur verfügbar ist. Die Proteine sind in chronologischer Reihenfolge ihrer ersten Veröffentlichung aufgelistet.

werden (Liebhold *et al.,* 2012; Liebhold *et al.,* 2013), bzw. für FgaPT2 auch die Übertragung einer Benzyleinheit von Benzyldiphosphat (Liebhold & Li 2013). Tabelle 1-1 gibt eine Übersicht über bisher charakterisierte PTasen der DMATS-Superfamilie.

Als Prenylierungspositionen kommen nicht nur die Kohlenstoffatome des Aromaten in Frage, sondern auch aromatische Stickstoffatome, wie im Fall von FtmPT2 (Grundmann *et al.,* 2008), sowie aromatische Hydroxylgruppen, wie mit SirD oder XptB (Kremer & Li 2010; Pockrandt *et al.,* 2012). TdiB aus *A. nidulans* führt in Didemethylasterrichinon D (DDAQ D) eine reverse Prenylierung am Indol-C2 und eine reguläre Prenylierung an Position 5 des Benzochinons ein, wobei für die zweite Prenylierung eine oxidoreduktive Umlagerung in Anwesenheit von weiteren Enzymen notwendig ist (s. Kapitel 1.4.2). Bietet man den Enzymen Substrate an, in denen die übliche Prenylierungsposition blockiert oder verändert ist, lassen sich so neue Produkte gewinnen. SirD zeigte sich mit C-, N-, O- und S-Prenylierungen besonders vielfältig, als es mit verschiedenen Tryptophan- und Phenylalaninderivaten inkubiert wurde (Rudolf & Poulter 2013; Zou *et al.,* 2011), und auch 4-DMATS aus *Claviceps purpurea* produzierte mit 4 Methyl-L-Tryptophan N1- und C3-prenylierte Substanzen (Rudolf *et al.,* 2013). Andere PTasen prenylierten auch für pilzliche Enzyme gänzlich unnatürliche Substrate wie Hydroxynaphthaline oder Flavonoide (Yu *et al.,* 2011; Yu & Li 2011). Diese Eigenschaften machen PTasen der DMATS-Superfamilie zu nützlichen Werkzeugen für die chemoenzymatische Synthese (Li 2010; Steffan *et al.,* 2009a; Yu & Li 2012), auch weil sie ihre stereospezifischen Eigenschaften beim Einsatz verschiedener Substrate behalten (Yu *et al.,* 2013).

Inzwischen sind mit PTasen dieser Familie reguläre Prenylierungen von Tryptophan-derivaten an jeder zugänglichen Position des Indolrings (N1, C2, C3, C4, C5, C6, C7) möglich. Reverse Prenylierungen sind zudem mit CTrpPT, BrePT, CdpC2PT, NotF, AnaPT und CdpC3PT an Position N1, C2 und C3 verfügbar (Ding *et al.,* 2010; Mundt & Li 2013; Yin *et al.,* 2013a; Yin *et al.,* 2009b; Yin *et al.,* 2010; Zou *et al.,* 2010).

Die Enzyme weisen untereinander häufig recht niedrige Sequenzidentitäten zwischen 20 – 30% auf (Steffan *et al.,* 2009a), es finden sich jedoch hoch konservierte Aminosäuren, die an der Koordinierung des Prenyldiphosphats beteiligt sind (vgl. Anhang: Multiprotein-sequenzvergleiche). Dies konnte erstmals durch die Aufklärung der Struktur von FgaPT2 bestätigt werden (Metzger *et al.,* 2009). Es zeigte sich, dass pilzliche PTasen der DMATS-Superfamilie eine gemeinsame Struktur mit den bakteriellen PTasen der CloQ/NphB-Gruppe aufweisen: ein zentraler Zylinder aus zehn antiparallelen β-Faltblattstrukturen, die von einem Ring von α-Helices umgeben sind. Bis heute konnten ähnliche Strukturen für FtmPT1, CdpNPT und AnaPT aufgeklärt werden (Jost *et al.,* 2010; Schuller *et al.,* 2012; Yu *et al.,* 2013) (Abbildung 1-7). Trotz der gemeinsamen Struktur besitzen beispielsweise FgaPT2 und NphB eine Sequenzidentität von lediglich 9% (Metzger *et al.,* 2009). Weiterhin scheint es

nicht möglich zu sein, aus der Aminosäuresequenz auf die Substratspezifität zu schließen (Tarcz *et al.,* 2014a).

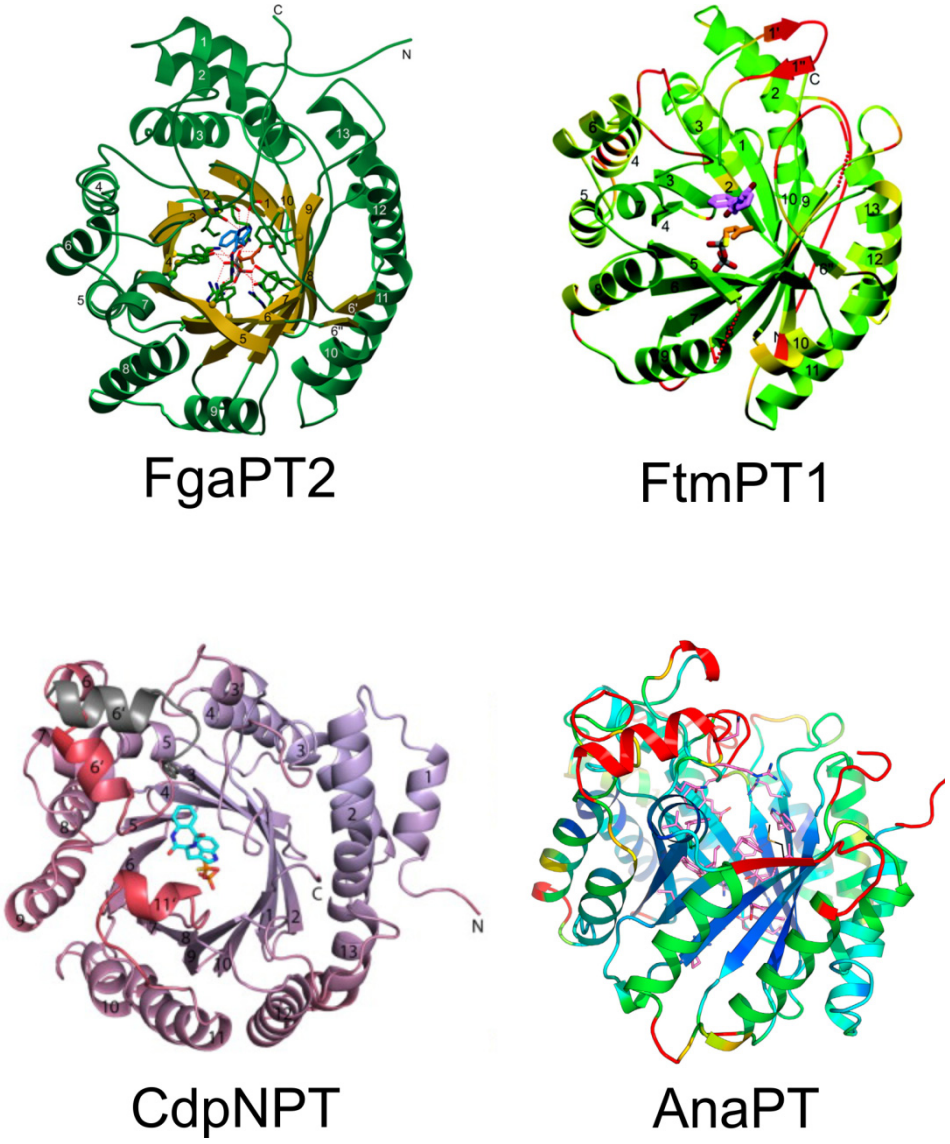


Abbildung 1-7: Dreidimensionale Strukturen von FgaPT2 (PDB-ID 3I4Z), FtmPT1 (3O2K), CdpNPT (4E0U) und AnaPT (4LD7) (Jost *et al.,* 2010; Metzger *et al.,* 2009; Schuller *et al.,* 2012; Yu *et al.,* 2013). FgaPT2, FtmPT1 und CdpNPT sind mit gebundenen Substraten im zentralen Zylinder dargestellt.

1.2.4.2. UbiA-Superfamilie

PTasen der UbiA-Superfamilie sind in die Biosynthese von Ubichinonen, Menachinonen und Plastochinonen involviert und katalysieren die Übertragung von all-*trans*-Prenyleinheiten auf Hydroxyphenylderivate wie 4-Hydroxybenzoat, 1,4-Dihydroxy-2-naphthoat oder Homogentisat und sind damit am Primärstoffwechsel aller Organismen beteiligt (Heide 2009). Alle PTasen dieser Familien sind membrangebunden und weisen in ihren Aminosäuresequenzen aspartatreiche Motive auf (NDxxDxxxD), die über zweiwertige

Kationen an der Koordinierung der Prenyldiphosphate beteiligt sind. Ihre Aktivität ist damit streng anhängig von der Anwesenheit von Ionen wie hauptsächlich Mg^{2+}, aber auch Mn^{2+}, Co^{2+} oder Ni^{2+}. Bisherige strukturelle Modelle stützten sich auf Vergleiche, Vorhersagen und zielgerichtete Mutagenseexperimente (Bräuer *et al.,* 2008; Ohara *et al.,* 2009). So konnte für die Oligoprenyl-4-hydoxybenzoattransferase (UbiA) aus *Escherichia coli* (*E. coli)* gezeigt werden, dass, anders als bisher vermutet, nur ein aktives Zentrum für die Katalyse verantwortlich ist (Bräuer *et al.,* 2008). Kürzlich konnte die Struktur des UbiA-Homologs ApUbiA aus *Aeropyrum pernix* aufgeklärt werden (Cheng & Li 2014). Hier wurden neun Transmembranhelices beobachtet, die U-förmig angeordnet sind und einen Hohlraum für das katalytische Zentrum bilden. Drei Helices bilden eine *loop*-Region, die sich über den zentralen Hohlraum stülpt und die beiden aspartatreichen Bereiche $D_{54}xxxD_{58}$ und $D_{182}xxxD_{186}$ enthält. Die Öffnung der zentralen Kavität ist dabei ins Innere der Membran gerichtet, sodass das aktive Zentrum weiterhin vom angrenzenden wässrigen Milieu abgeschirmt ist.

Neben UbiA (Melzer & Heide 1994) wurde mit der 4-Hydroxybenzoat:Polyprenyl-transferase COQ2 aus *Saccharomyces cerevisiae* (Ashby *et al.,* 1992) eine PTase aus dem Primärstoffwechsel charakterisiert, die an der Biosynthese von Ubichinonen beteiligt ist. Doch auch im pflanzlichen Sekundärstoffwechsel sind solche Enzyme zu finden. So ist SfN8DT-1 aus *Sophora flavescens* für die Prenylierung von Naringenin verantwortlich (Sasaki *et al.,* 2008), LePGT1 aus *Lithospermum erythrorhizon* für die Prenylierung von 4-Hydroxybenzoat in der Biosynthese von Shikonin (Yazaki *et al.,* 2002); GmG4DT aus *Glycine max* ist in die Biosynthese von Phytoallexinen involviert (Akashi *et al.,* 2009). Auch das Myxobakterium *Stigmatella aurantiaca* produziert antibiotisch wirksame Aurachine (Kunze *et al.,* 1987), an deren Biosynthese die Farnesyltransferase AuaA beteiligt ist (Stec *et al.,* 2011).

1.2.4.3 LtxC-Gruppe

Namensgebendes Enzym ist LtxC aus dem Cyanobakterium *Lyngbya majuscula*, das die reverse Übertragung eines Geranylrests auf (−)-Indolactam V als letzten Schritt in der Biosynthese von Lyngbyatoxin A katalysiert (Edwards & Gerwick 2004). PTasen dieser Gruppe werden auch als bakterielle Indolprenyltransferasen bezeichnet und zeigen niedrige Ähnlichkeiten zu Enzymen der bereits genannten Gruppen; *in silico*-Strukturvorhersagen zeigten allerdings, dass möglicherweise ebenfalls Faltungen in Form des *PT-barrels* vorliegen (Bonitz *et al.,* 2011). Verwandte Enzyme sind IptA, eine 6-Dimethylallyl-tryptophansynthase aus *Streptomyces* sp. (Takahashi *et al.,* 2010), CymD, das eine reverse *N*-Prenylierung in der Biosynthese von Cyclomarinen in *Salinispora arenicola* einführt (Schultz *et al.,* 2008) und SCO7467, eine 5-Dimethylallyltryptophansynthase aus

Streptomyces coelicolor (Ozaki *et al.,* 2013). Takahashi und Co-Autoren wiesen dieser PTase-Gruppe eine Position zwischen den pilzlichen Enzymen der DMATS-Superfamilie und den bakteriellen Enzymen der CloQ/NphB-Gruppe zu und identifizierten mit SAML0654 aus *Streptomyces ambofaciens* ein putatives Protein, das mit hoher Wahrscheinlichkeit ebenfalls in die LtxC-Gruppe gehört (Takahashi *et al.,* 2010). Dieses Protein und sein Homologes Strvi8510 aus *Streptomyces violaceusniger* konnten kürzlich als 6-Dimethylallyltryptophan-synthasen identifiziert werden (Winkelblech & Li 2014).

Die Aufklärung der Struktur eines dieser Proteine könnte Aufschluss darüber bringen, ob die LtxC-Gruppe tatsächlich der PT-Barrel-Superfamilie zuzuordnen ist oder eine eigenständige Gruppe darstellt.

1.3 Nichtribosomale Peptidsynthetasen

Neben den Polyketidsynthasen (PKS) gehören die nichtribosomalen Peptid-synthetasen (NRPS) zu der wichtigen Gruppe von modular aufgebauten Enzymen, die an der Biosynthese von Sekundärmetaboliten hauptsächlich in Mikroorganismen wie Bakterien und Pilzen beteiligt sind. Ihre Produkte haben wichtige Eigenschaften im Metabolismus des produzierenden Organismus, wie die Bindung von Eisen durch Siderophore (Neilands 1995), sie können ihrem Produzenten aber auch Vorteile gegenüber anderen Organismen in seiner Umwelt verleihen. Wegen ihrer zahlreichen antibiotischen, immunsuppressiven oder zytostatischen Wirkungen haben viele nichtribosomale Peptide (NRP), wie beispielsweise das Ciclosporin, als Wirkstoffe ihren Eingang in die moderne Medizin gefunden (Schwarzer *et al.,* 2003).

Unterschieden werden NRPS mit einem oder mehreren Modulen samt Konden-sationsdomänen, denen Aminosäuren als Substrate dienen, und NRPS-ähnliche Enzyme ohne Kondensationsdomänen, die Derivate von Aminosäuren verarbeiten.

1.3.1 Modulare nichtribosomale Peptidsynthetasen

NRPS sind hochkomplexe, modular aufgebaute Enzyme, wobei jedes Modul aus mehreren Domänen bestehen kann. Substrate können proteinogene oder nicht proteinogene Aminosäuren sein, jedes Modul ist dabei für die Erkennung und Verarbeitung einer Aminosäure verantwortlich (Marahiel *et al.,* 1997). Dazu ist jedes Modul wiederum aus mehreren Domänen aufgebaut (Abbildung 1-8), die die kleinste enzymatische Einheit in der NRPS repräsentieren und die einzelnen Reaktionen während der NRP-Synthese katalysieren (Stachelhaus & Marahiel 1995). Das Substrat wird dabei von jeder Domäne vom N- bis zum C-Terminus weitergereicht, was an eine Prozessierung am Fließband (*assembly line*) erinnert.

Jede Reaktion beginnt mit der Aktivierung einer spezifischen Aminosäure durch die Adenylierungsdomäne (A-Domäne) unter ATP-Verbrauch. Die aktivierte Aminosäure wird anschließend in Form eines Thioesters auf die Thiolierungsdomäne (T-Domäne, auch PCP-Domäne: *peptidyl carrier protein*) übertragen, die für den weiteren Transport verantwortlich ist. Im Zuge einer posttranslationalen Modifikation muss die NRPS hierzu in ihre *holo*-Form überführt werden (Schwarzer *et al.,* 2003). Dabei wird 4'-Phosphopantethein mittels 4-Phosphopantetheinyltransferase von Coenzym A auf ein konserviertes Serin innerhalb der T-Domäne übertragen.

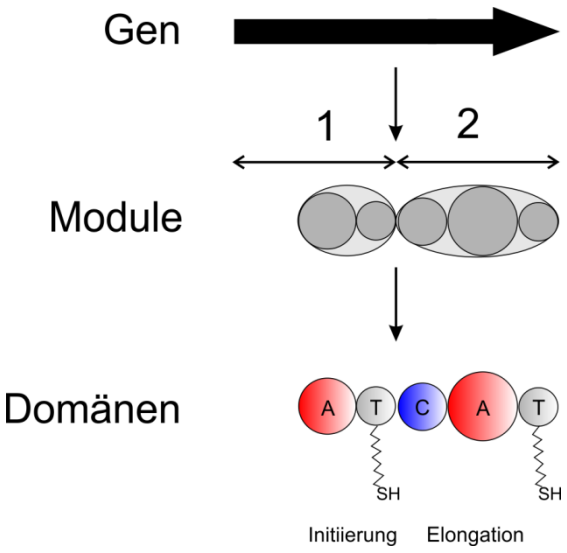


Abbildung 1-8: Vereinfachte Darstellung des modularen Aufbaus einer NRPS (modifiziert nach Finking & Marahiel 2004). Jedes Modul ist für die Erkennung und Verarbeitung einer spezifischen Aminosäure verantwortlich und besteht aus mehreren Domänen. A: A-Domäne. T: T-Domäne. C: C-Domäne. Erklärung im Text. An der T-Domäne ist die prosthetische Gruppe 4'-Phosphopantethein ist in einer vereinfachten Form dargestellt.

Mit PheA konnte die Phenylalanin-aktivierende A-Domäne der Gramicidin-synthetase 1 (GrsA) kristallisiert und ihre Struktur aufgeklärt werden (Conti *et al.,* 1997). Dabei konnten Aminosäuren in der Sequenz identifiziert werden, die in homologen Proteinen teilweise konserviert sind und sich in Abhängigkeit von der zu aktivierenden Aminosäure zu Mustern zusammensetzen lassen. Daraus abgeleitet, wurde anfangs ein acht Aminosäuren umfassender „NRPS-Code" postuliert, der es ermöglichen sollte, aus der Sequenz von noch nicht charakterisierten NRPS auf das Substrat der A-Domäne zu schließen. Inzwischen konnte dieser NRPS-Code auf zehn Positionen und um mehrere Substrate erweitert werden (Kalb *et al.,* 2013; May *et al.,* 2002; Stachelhaus *et al.,* 1999). Eine bioinformatische Vorhersage ist nun auch mit der Anwendung des *NRPSpredictor2* möglich (Röttig *et al.,* 2011). Da die Daten aber auf bakteriellen Enzymen basieren, ist eine Vorhersage für pilzliche NRPS schwierig, da diese scheinbar eine höhere Variabilität trotz ähnlicher Substrate aufweisen (Bushley *et al.,* 2008).

Nach Aktivierung und Thiolierung wird das Substrat durch die Kondensationsdomäne (C-Domäne) mit der nächsten aktivierten Aminosäure über Peptidbindungen verknüpft (Abbildung 1-9). Auf diese Weise wird in Richtung des C-Terminus eine wachsende Peptidkette weitergereicht. Zum Schluss erfolgt die Abspaltung durch die Thioesterase-domäne (TE-Domäne) durch Hydrolyse oder Zyklisierung der ersten und letzten Aminosäure.

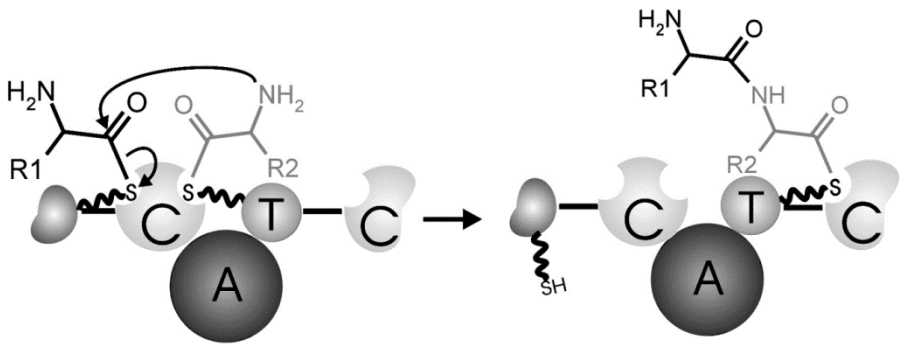


Abbildung 1-9: Schematische Darstellung des Kondensationsschritts (modifiziert nach Finking & Marahiel 2004). Die beiden aktivierten Aminosäuren sind als Thioester mit der T-Domäne verbunden. Durch die Kondensationsdomäne (C) findet die Verknüpfung über eine Peptidbindung statt, die Thioesterbindung der ersten Aminosäure wird dabei gespalten. Das entstehende Dipeptid ist als Thioester mit der zweiten T-Domäne verbunden.

Initiationsmodule bestehen mindestens aus einer Adenylierungs- und einer Thiolierungsdomäne, Elongationsmodule mindestens aus einer Adenylierungs-, einer Thiolierungs- und Kondensationsdomäne. Darüberhinaus können Elongationsmodule zusätzliche Domänen wie Epimerisierungsdomänen (E-Domänen), die die L-Konfiguration der Substrataminosäuren ändern, Oxidationsdomänen (Ox-Domänen) und *N*-Methylierungs-domänen (M-Domänen) enthalten. Die Kondensationsdomäne kann außerdem durch eine Zyklisierungsdomäne (Cy-Domäne) ersetzt werden, die statt einfachen Peptidbindungen heterozyklische Oxazoline oder Thiazoline produziert. Ferner kann die Thioesterasedomäne durch eine Reduktasedomäne (R-Domäne) ersetzt werden (Schwarzer & Marahiel 2001).

NRPS können nach der Abfolge der Kondensationsreaktionen in drei Gruppen unterteilt werden (Mootz *et al.,* 2002). Bei den linearen NRPS (Typ A) besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Abfolge der Module und der Sequenz des produzierten Peptids. Die Produktion verläuft linear vom N- zum C-Terminus. Beispiele solcher Produkte sind Tyrocidin oder Bacitracin (Abbildung 1-10). In iterativen NRPS (Typ B) können Module mehrmals genutzt werden, sodass größere Peptidketten entstehen als aus der Anzahl der Module zu erwarten wäre. Solche Produkte sind Gramicidin S und Enterobactin. Vibriobactin wird durch eine nichtlineare NRPS (Typ C) synthetisiert. Deren Struktur weicht von der gewöhnlichen A-T-(C-A-T)$_n$-TE-Abfolge ab und zeigt mindestens eine veränderte (C-A-T)-Folge, deren biosynthetische Bedeutung noch nicht hinreichend verstanden ist.

Da sowohl NRPS als auch PKS die modulare Struktur einen vergleichbaren Elongationsmechanismus besitzen, können schließlich kombinierte NRPS-PKS-Hybrid-enzyme auftreten, wenn einzelne PKS-Module in die NRPS-Sequenz integriert werden, wie beispielsweise in der Biosynthese von Yersiniabactin, Aspyridon A und Pseurotin A. Dabei können zusätzliche Acyltransferase- (AT)-Domänen, die entsprechend den A-Domänen für

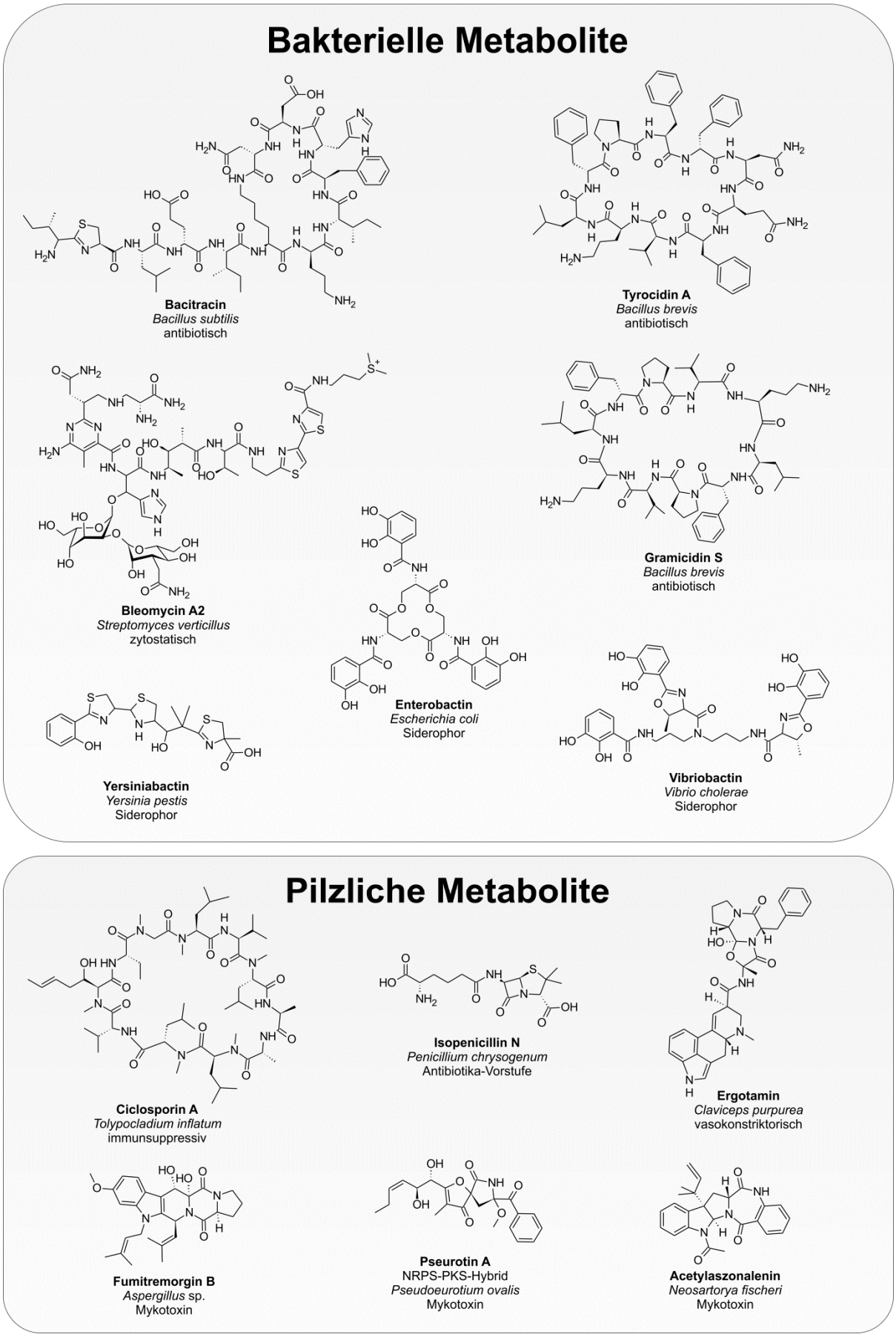


Abbildung 1-10: Beispiele einiger mikrobieller Sekundärmetabolite, an deren Biosynthese NRPS oder NRPS-PKS beteiligt sind. Angegeben ist der Haupt- oder der erste beschriebene Produzent.

die Substraterkennung zuständig sind, und Ketosynthase- (KS)-Domänen auftreten, die Claisen-Kondensationen durchführen (Schwarzer *et al.,* 2003). Nach Aktivierung werden die von Malonyl-CoA stammenden Verlängerungseinheiten über das Transportprotein (*acyl carrier protein*, ACP) auf eine an der KS-Domäne gebundene Aceteteinheit übertragen. Im Anschluss können verschiedene Prozessierungen an Ketoreduktase- (KR), Dehydratase- (DH) oder Enoylreduktase- (ER)-Domänen durchgeführt werden (Boettger & Hertweck 2013).

Während von Bakterien häufig makrozyklische Verbindungen synthetisiert werden, sind in Ascomyceten Kondensationsprodukte bestehend aus zwei Aminosäuren weit verbreitet. Dabei werden unter Bildung eines Diketopiperazins zwei Peptidbindungen geschlossen, die Produkte werden auch als cyclische Dipeptide bezeichnet. Neben cyclischen Dipeptiden aus proteinogenen Aminosäuren, wie beispielsweise *cyclo*-L-Trp-L-Pro als Vorläufersubstanz des Mykotoxins Fumitremorgin B (Abbildung 1-10), existieren auch Kondensationsprodukte, die Anthranilat als Baustein enthalten, wie z. B. Acetylaszonalenin aus *Neosartorya fischeri*. Der Peptidanteil des Ergotamins (Abbildung 1-10), als Beispiel der Ergopeptine, stellt ein cyclisches Tripeptid dar, das durch die D-Lysergylpeptidsynthetasen (LPS) synthetisiert wird (Riederer *et al.,* 1996).

Die Tatsache, dass jede Domäne eine eigenständige enzymatische Einheit darstellt, bietet die Möglichkeit, durch kombinatorische Ansätze oder Mutationen maßgeschneiderte Enzyme für die Produktion von neuen Wirkstoffen zu entwickeln (Cane *et al.,* 1998).

1.3.2 Nichtribosomale Peptidsynthetase-ähnliche Enzyme

NRPS-ähnliche (auch *NRPS-like*) Enzyme treten hauptsächlich in Pilzen auf und bestehen aus einem Modul, das keine Kondensationsdomäne enthält. Der erste charakterisierte Vertreter war die Bisindolylbenzochinonsynthetase TdiA aus *Aspergillus nidulans* (Bok *et al.*, 2006). Diese ist aus drei Domänen (A-T-TE) aufgebaut, die für die Adenylierung, Thiolierung und Thioesterspaltung verantwortlich sind (Balibar *et al.,* 2007). Da das Produkt DDAQ D keine Peptidbindungen enthält, ist eine für die NRPS typische C-Domäne nicht notwendig. Nach posttranslationaler Modifikation durch eine Phosphopantetheinyltransferase akzeptierte TdiA keine Aminosäuren als Substrate, sondern ausschließlich α-Ketosäuren. Nach ATP-abhängiger Aktivierung des Substrats Indolpyruvat durch die A-Domäne wird es auf dem Phosphopantetheinyl-Arm der T-Domäne übertragen. Durch Mutageneseexperimente konnte gezeigt werden, dass das Serin 774 der TE-Domäne im weiteren Verlauf der Katalyse das Substrat aufnimmt (Balibar *et al.,* 2007). Die A- und T-Domänen sind dann für die Aufnahme eines weiteren Moleküls Indolpyruvat bereit. Es kommt zu einem Zustand, in dem zwei Moleküle Indolpyruvat am Enzym gebunden sind,

eines als Thioester an der T-Domäne und das zweite als Ester an der TE-Domäne (Abbildung 1-11, A). Es folgt eine doppelte Claisen-Kondensation, die zur Bildung zweier C-C-Bindungen mit anschließender Chinonbildung und Freisetzung des Produkts führt. Vergleicht man die Aminosäuren aus TdiA entsprechend des NRPS-Codes mit anderen NRPS, zeigt sich, dass sich in α-Ketosäuren-akzeptierenden Enzymen, also den NRPS-ähnlichen Proteinen, entweder ein Alanin oder ein Valin an der ersten Position befindet (Abbildung 1-11, B), während Tryptophan-akzeptierende Enzyme hier ein Aspartat und Anthranilat-akzeptierende ein Glycin aufweisen (Kalb *et al.,* 2013). Dieses Aspartat ist in den NRPS normalerweise für die Koordinierung der α-Aminogruppe einer Substrataminosäure zuständig. Dies spricht dafür, dass tatsächlich Valin an erster und Alanin an zweiter Position entscheidend für die Aktivierung von α-Ketosäuren sind.

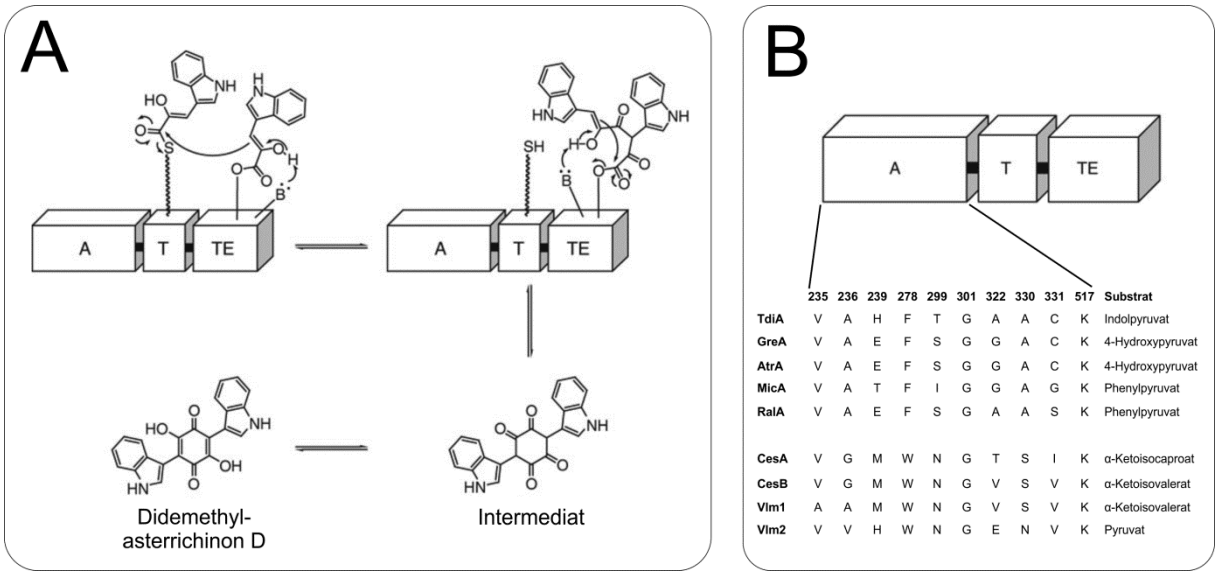


Abbildung 1-11: Schematische Darstellung des Mechanismus der Dimerisierung von Indolypyruvat durch TdiA (A) und der Domänenstruktur von TdiA (B) (modifiziert nach Balibar *et al.,* 2007). Der Ausschnitt unter B listet die Aminosäuren in TdiA entsprechend des NRPS-Codes auf und vergleicht mit denen von NRPS, die aromatische oder aliphatische α-Ketosäuren akzeptieren (Kalb *et al.,* 2013; Wackler *et al.,* 2012). Die Nummerierung entspricht den Positionen in PheA.

Weitere Beispiele für charakterisierte NRPS-ähnliche Proteine sind MicA aus der Biosynthese von Microperfuranon aus *Aspergillus nidulans* (Yeh *et al.,* 2012), GreA aus *Suillus grevillei* (Wackler *et al.,* 2012) und AtrA aus *Tapinella panuoides* (Schneider *et al.,* 2008a), die beide für die Biosynthese von Atromentin verantwortlich sind, sowie RalA aus der Biosynthese von Ralfuranon und Ralfuranon B aus *Ralstonia solanacearum* (Wackler *et al.,* 2011). Daneben konnten mit LnaA, LnbA und ATEG_03630 einmodulare Enzyme mit einer ungewöhnlichen A-T-R-Domänenstruktur, d. h. mit Reduktase- statt Thioesterase-domäne, charakterisiert werden, die keine α-Ketosäuren als Substrate akzeptieren (Tabelle 1-2). ArmA aus dem Basidiomyceten *Armillaria mellea* weist dagegen die typische A-T-TE-

Struktur auf, akzeptiert jedoch L-Leucin als Substrat; ein Endprodukt dieser Biosynthese ist nicht bekannt (Misiek *et al.,* 2011).

Tabelle 1-2: Übersicht der charakterisierten NRPS-ähnlichen Enzymen.

Enzym	Organismus	Domänen	NRPS-Code	Substrat	Referenz
TdiA	*Aspergillus nidulans*	A-T-TE	VAHFTGAACK	Indolpyruvat	(Balibar *et al.,* 2007)
AtrA (ACH90386)	*Tapinella panuoides* DSM 6421	A-T-TE	VAEFSGGACK	4-Hydroxyphenyl-pyruvat	(Schneider *et al.,* 2008a)
GreA (AFB76152)	*Suillus grevillei*	A-T-TE	VAEFSGGACK	4-Hydroxyphenyl-pyruvat	(Wackler *et al.,* 2012)
MicA	*Aspergillus nidulans*	A-T-TE	VATFIGGAGK	Phenylpyruvat	(Yeh *et al.,* 2012)
RalA (AEC03968)	*Ralstonia solanacearum*	A-T-TE	VAEFSGAASK	4-Hydroxyphenyl-pyruvat	(Wackler *et al.,* 2011)
ArmA	*Armillaria mellea*	A-T-TE	TMSSTAVVLK	L-Leucin	(Misiek *et al.,* 2011)
LnaA	*Aspergillus flavus* NRRL 3357	A-T-R	-	L-Tyrosin	(Forseth *et al.,* 2013)
LnbA	*Aspergillus flavus* NRRL 3357	A-T-R	-	L-Tyrosin	(Forseth *et al.,* 2013)
ATEG_03630 (EAU35432)	*Aspergillus terreus*	A-T-R	GFVTLGHPLS	5-Methylorsellin-säure	(Wang & Zhao 2014)

A: Adenylierunsgdomäne. T: Thiolierungsdomäne, TE: Thioesterasedomäne. R: Thioesterreduktasedomäne.
Angegeben ist der Proteinname mit NCBI-Zugriffsbezeichnung.

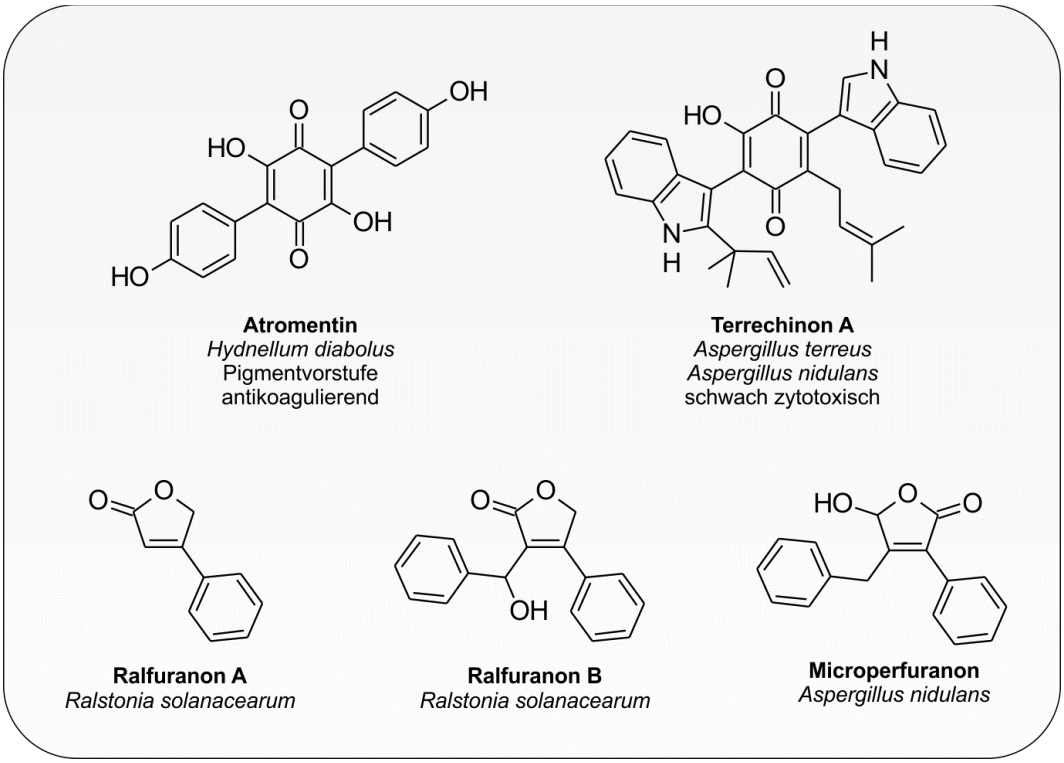


Abbildung 1-12: Beispiele einiger mikrobieller Sekundärmetabolite, an deren Biosynthese NRPS-ähnliche Enzyme beteiligt sind.

1.4 Prenylierte Sekundärmetabolite

1.4.1 Indolalkaloide

Prenylierte Indolalkaloide sind weit verbreitete bioaktive Substanzen aus pflanzlichen, pilzlichen und bakteriellen Quellen. Der Indolanteil hat seinen biosynthetischen Ursprung häufig in L-Tryptophan, während der Prenylrest meist in Form von DMAPP aus dem Isoprenoidstoffwechsel stammt. Die Prenylierung ist dabei ein wichtiges Strukturmerkmal, da diese meist die biologische Aktivität der betreffenden Substanz deutlich erhöht (Botta *et al.,* 2005b; Usui *et al.,* 1998; Wollinsky *et al.,* 2012a). Dabei sind die biologischen Aktivitäten ebenso vielfältig wie die strukturelle Varianz. Die wohl bekanntesten Vertreter dieser Substanzklasse sind die Ergotalkaloide, die ursprünglich aus *Claviceps purpurea* aus der Familie der Clavicipitaceae isoliert wurden. Je nach Modifikation können drei Gruppen von Ergotalkaloiden unterschieden werden: Alkaloide des Clavin-Typs, die aus einem tri- oder tetrazyklischen System bestehen (z. B. Fumigaclavine), die Ergoamide, die Amidderivate der D-Lysergsäure und einfachen aliphatischen Ketten darstellen (z. B. Ergometrin) und die Peptidalkaloide, bei denen es sich um Kondensationsprodukte der D-Lysergsäure mit Tripeptiden handelt (z. B. Ergotamin, Abbildung 1-10) (Flieger *et al.,* 1997; Wallwey & Li 2011). Ergotalkaloide können im Zentralnervensystem als Agonisten oder Antagonisten an Dopamin-, Adreno- und Serotoninrezeptoren angreifen, wodurch diverse pharmakologische Wirkungen unterschieden werden. Seit dem Mittelalter sind Vergiftungen (Ergotismus, „Antoniusfeuer“) mit durch *Claviceps purpurea* kontaminiertem Roggen[6] bekannt, die durch die vasokonstriktorischen Eigenschaften einiger Ergotalkaloide zu Durchblutungsstörungen und damit zu Halluzinationen und Parästhesien in den Extremitäten bis hin zu Gangränen führten (Tudzynski *et al.,* 2001). Etwa ebenso lange waren den Hebammen auch die nützlichen therapeutischen Eigenschaften als uteruskontrahierendes Wehenmittel und Stiller von postpartalen Blutungen bekannt, daher auch der Name „Mutterkorn“ der Droge *Secale cornutum*[7]. Derzeit sind die Hauptanwendungsgebiete von Ergotalkaloiden und partial-synthetischen Derivaten vor allem die Migräne- (Ergotamin), die Alzheimer- (Nicergolin, Dihydroergotoxin) und Parkinsontherapie sowie die Geburtshilfe (Bromocriptin, Cabergolin)[8]. Die Biosynthese der Ergotalkaloide beginnt mit der Prenylierung von L-Tryptophan durch eine 4-DMATS (1.2.4.1.2.), während die Peptidanteile durch NRPS (1.3.1) geliefert werden.

Biosynthetische Gene für ein bestimmtes Produkt liegen in Pilzen häufig geclustert vor und bilden eine regulatorische Einheit. Das Verruculogen-Cluster in *A. fumigatus* Af293

---

[6] Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) hält bei Kindern bis 4 Jahre und Schwangeren das Auftreten von unerwünschten gesundheitlichen Wirkungen bei Verzehr von Roggenmehlprodukten für möglich. Stellungnahme Nr. 024/2013 des BfR vom 7. November 2012, aktualisiert am 28.08.2013.

[7] Oder auch von „verändertes Korn“, von lateinisch: *mutare*.

[8] Entsprechende, aktuell verfügbare Präparate sind in der Roten Liste in den Hauptgruppen 11 (Antidementiva), 46 (Gynäkologika), 61 (Migränemittel) und 70 (Parkinsonmittel) zu finden.

besteht aus acht Genen, die für eine NRPS (FtmPS, A-T-C-A-T-C-Domänen), zwei PTasen (FtmPT1 und FtmPT2), drei Cytochrom P450-Enzymen (FtmP450-1, FtmP450-2 und FtmP450-3), eine Methyltransferase (FtmMT) und eine α-Ketoglutarat-abhängige Dioxygenase (FtmOx1) kodieren (Li 2011). Für das zunächst vermutete neunte Gen *ftmO* konnte keine Beteiligung an der Verruculogen-Biosynthese gefunden werden (Kato *et al.,* 2009; Matuschek 2012). Die Biosynthese (Abbildung 1-13) beginnt mit der Kondensation von L-Tryptophan und L-Prolin zu Brevianamid F durch FtmPS (Maiya *et al.,* 2006), FtmPT1 katalysiert im Anschluss die reguläre C-2-Prenylierung (Grundmann & Li 2005). Durch Geninaktivierungen in *A. fumigatus* konnten die Hydroxylierung von Tryprostatin B, die Oxidation von Tryprostatin A und die Hydroxylierung von Fumitremorgin C den jeweils Proteinen FtmP450-1, -2 und -3 zugeordnet werden (Kato *et al.,* 2009). Ebenso konnte die *O*-Methylierung von 6-Hydroxytryprostatin B durch FtmMT durch Mutationsexperimente bestätigt werden (Kato *et al.,* 2013). FtmPT2 katalysiert die *N*-Prenylierung von 12,13-Dihydroxyfumitremorgin C (Grundmann *et al.,* 2008), das durch FtmOx1 in Anwesenheit von zweiwertigem Eisen, Sauerstoff und α-Ketoglutarat zu Verruculogen oxidiert wird (Steffan *et al.,* 2009b). *In vitro*-Reaktionsansätze mit FtmOx1 konnten erfolgreich mit Ascorbat als Reduktionsmittel durchgeführt werden, das *in vivo*-Reduktionsmittel ist allerdings nicht bekannt.

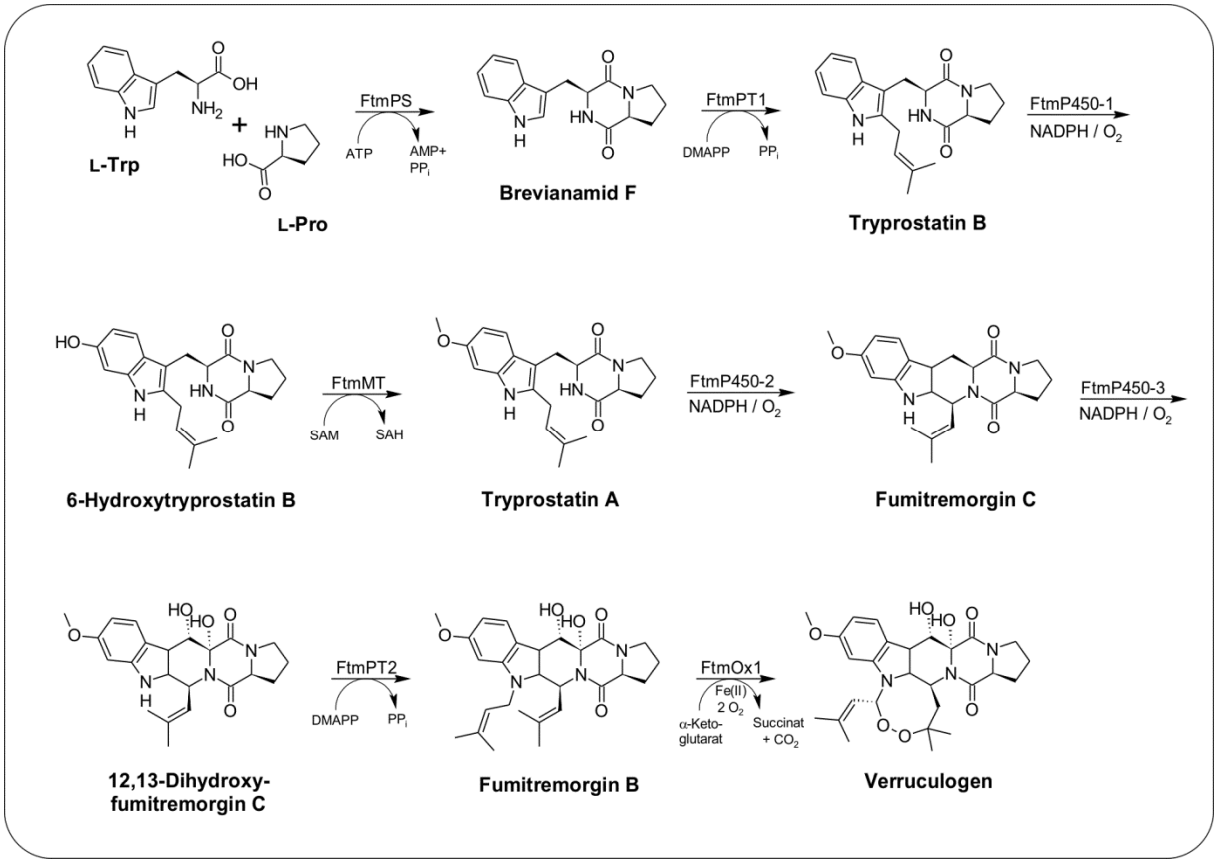


Abbildung 1-13: Schema der Biosynthese von Verruculogen in *A. fumigatus*.

Ein homologes Cluster ist auch in *Neosartorya fischeri* zu finden. Nach Entdeckung des Fumitremorgins A in diesem Pilz konnte mithilfe von chemischen, bioinformatischen und biochemischen Methoden gezeigt werden, dass FtmPT3 für die zusätzliche Prenylierung von Verruculogen zu Fumitremorgin A verantwortlich ist (Mundt *et al.,* 2012). FtmPT3 konnte bis dahin nicht mit der Biosynthese der Fumitremorgine in Verbindung gebracht werden, da das codierende Gen nicht innerhalb des *ftm*-Clusters, sondern sogar auf einem anderen Chromosom vorliegt.

Für Fumitremorgin C konnte eine Hemmung des Brustkrebs-Resistenz-Proteins (*breast cancer resistance protein*, BCRP) beschrieben werden (Rabindran *et al.,* 2000), das als ABC-Transporter am Efflux von Wirkstoffen beteiligt ist und während einer Chemotherapie häufig überexprimiert wird und so zu Resistenzen führen kann. Tryprostatin B und A zeigten eine zytotoxische Wirkung durch Inhibierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase (Zhao *et al.,* 2002).

Brevianamid F kann zudem auch als Vorläufer von Substanzen wie Spirotryprostatinen, Malbrancheamiden, Stephacidinen und Notoamiden fungieren (Ding *et al.,* 2010; Tsunematsu *et al.,* 2013). Beispielhaft sind einige Strukturformeln in Abbildung 1-14 dargestellt. Vertreter der cyclischen Dipeptide, die aus zwei Tryptophaneinheiten aufgebaut sind, konnten aus *Penicillium fellutanum* isoliert werden und werden dementsprechend Fellutanine genannt (Kozlovsky *et al.,* 2000). Substanzen, die ihren Ursprung in der Kondensation von Tryptophan und Histidin haben, wie die Roquefortine, Glandicoline und Meleagrine, wurden aus *Penicillium roqueforti* und *Penicillium chrysogenum* isoliert (Ali *et al.,* 2013). Mykotoxine mit Anthranilatanteil sind die Aszonalenine (Abbildung 1-10) aus *Aspergillus* sp. und *Neosartorya fischeri* sowie Asterrelenin aus *Aspergillus terreus* (Gao *et al.,* 2012; Li *et al.,* 2005; Yin *et al.,* 2009b). Tryptophan und Phenylalanin liefern die Vorläufer für Fructigenine aus *Penicillium fructigenum* (Arai *et al.,* 1989; Sohn *et al.,* 2013). Echinulin aus *Aspergillus amstelodami* hat seinen biosynthetischen Ursprung in *cyclo*-L-Trp-L-Ala (Birch *et al.,* 1961; Slack *et al.,* 2009). Astechrom aus *Aspergillus terreus* und Hexadehydroastechrom aus *Aspergillus fumigatus* zeigen interessante Modifikationen der Diketopiperazineinheit und bilden Eisenkomplexe (Arai *et al.,* 1981b; Yin *et al.,* 2013b).

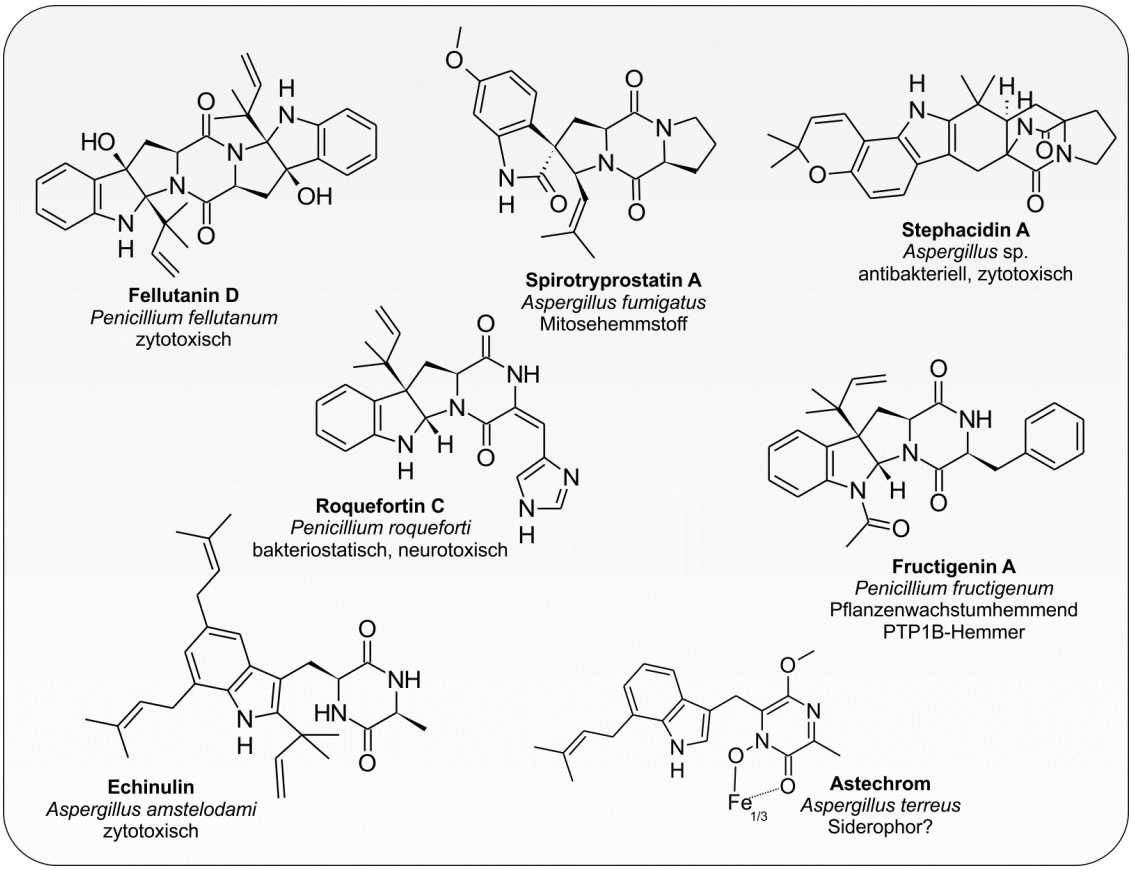


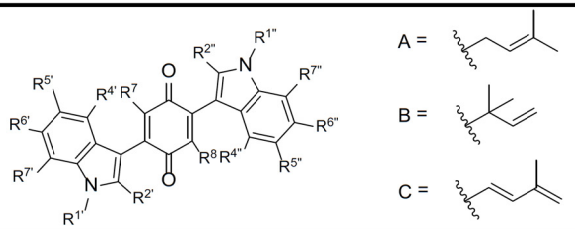
Abbildung 1-14: Beispiele von pilzlichen prenylierten Indolalkaloiden.

1.4.2 Bisindolylbenzochinone

Als besonderen Vertreter der prenylierten Indolalkaloide werden die Bisindolyl-benzochinone gesondert besprochen.

Die Beobachtung, dass farbige Metabolite von *Chaetomium* spp. antibiotische Eigenschaften besitzen, führte zur Isolierung des Cochliodinols, eines violetten Pigments (λ_{max} 475 nm), aus *C. cochliodes* und *C. globosum* (Brewer *et al.,* 1968). Die Substanz war schwach sauer (pK_a 6,7) und ergab mit starken Basen grüne Salze. Nach Reduktion mit Schwefelwasserstoff verschwand diese Färbung, konnte aber durch Oxidation mit Sauerstoff wieder hergestellt werden (Jerram *et al.,* 1975). Diese Eigenschaft war schon von Farbstoffen der Chinonklasse bekannt und half, die Struktur des Cochliodinols als 2,5-Dihydroxy-3,6-bis(5‘-dimethylallylindolyl)-1,4-benzochinon aufzuklären (Tabelle 1-3). In Aktivitätstests wirkte es sich hemmend auf das Wachstum von verschiedenen Ascomyceten und Bakterien und auf die Keimung von Sporen der Pflanzenpathogene *Botrytis allii* und *Fusarium moniliforme* aus, zeigte aber keine Zytotoxizität und keine Symptome akuter Toxizität in Ratten und Truthähnen (Brewer *et al.,* 1970). Vergleiche mit unterschiedlichen

Tabelle 1-3: Übersicht über die natürlich vorkommenden Bisindolylbenzochinone.



Name	R^7	R^8	$R^{1'}$	$R^{2'}$	$R^{4'}$	$R^{5'}$	$R^{6'}$	$R^{7'}$	$R^{1''}$	$R^{2''}$	$R^{4''}$	$R^{5''}$	$R^{6''}$	$R^{7''}$	Referenz
DDAQ D	OH	OH	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(Fredenhagen *et al.*, 1997)
AQ D	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ	OH	OH	**B**	H	H	H	H	H	**B**	H	H	H	H	H	(Yamamoto *et al.*, 1976b)
AQ-Monoacetat	OH	OAc	**B**	H	H	H	H	H	**B**	H	H	H	H	H	(Kaji *et al.*, 1994)
Iso-AQ	OH	OH	**B**	H	H	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	(Kaji *et al.*, 1994)
AQ Su5501	OH	OH	**B**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	**A**	(Alvi *et al.*, 1999)
AQ SU5228	OH	OH	H	**A**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(Alvi *et al.*, 1999)
Neo-AQ = AQ CT5	OH	OH	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	(Kaji *et al.*, 1994)
AQ SU5500	OAc	OH	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	(Alvi *et al.*, 1999)
AQ SU5503	OH	OH	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	H	H	H	COOH	(Alvi *et al.*, 1999)
Cochliodinol	OH	OH	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	H	H	(Brewer *et al.*, 1968)
Isocochliodinol	OH	OH	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	H	(Sekita 1983)
Neochochliodinol	OH	OH	H	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	(Sekita 1983)
Semicochliodinol A	OH	OH	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	H	H	H	(Fredenhagen *et al.*, 1997)
Semicochliodinol B	OH	OH	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	H	H	(Fredenhagen *et al.*, 1997)
Hinnulichinon	OH	OH	H	**B**	H	H	H	H	H	**B**	H	H	H	H	(O'Leary *et al.*, 1984)
DAQ B1	OH	OH	H	**B**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	**A**	(Zhang *et al.*, 1999)
AQ CT1	OH	OH	H	H	H	H	**C**	H	H	H	H	H	**C**	H	(Mocek *et al.*, 1996)
AQ CT2	OH	OH	H	H	H	H	**C**	H	H	H	H	H	**A**	H	(Mocek *et al.*, 1996)
AQ CT3	OH	OH	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	H	(Mocek *et al.*, 1996)
AQ CT4	OH	OH	H	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	(Mocek *et al.*, 1996)
Ochrindol D	OH	**A**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(De Guzman *et al.*, 1994)
Terrechinon A	OH	**A**	H	**B**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(He *et al.*, 2004)
AQ A1	OCH_3	OCH_3	**B**	H	H	H	H	H	**B**	H	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ A2	OCH_3	OCH_3	H	**B**	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ A3	OCH_3	OCH_3	**B**	H	H	H	H	H	H	**B**	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ A4	OCH_3	OCH_3	H	**B**	H	H	H	**A**	H	**B**	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ B1	OCH_3	OCH_3	H	**B**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	**A**	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ B2	OCH_3	OCH_3	H	**B**	H	H	H	**A**	H	H	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ B3	OCH_3	OCH_3	**B**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ B4	OCH_3	OCH_3	H	**B**	H	H	H	H	H	**B**	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ C1	OCH_3	OCH_3	H	**B**	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ C2	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	**A**	(Arai *et al.*, 1981a)
AQ F	OCH_3	OCH_3	H	**A**	H	H	H	H	H	**A**	H	H	H	H	(Arai 1984)

Abkürzungen: AQ: Asterrichinon. DAQ: Demethylasterrichinon. DDAQ: Didemethylasterrichinon. Ac: Acetat.

natürlich vorkommenden 2,5-Dihydroxy-1,4-benzochinonderivaten lieferten Hinweise darauf, dass die antibiotische Aktivität umgekehrt proportional zur Polarität der Substituenten an den Positionen 3 und 6 war (Brewer *et al.,* 1984).

Seit dem konnten verschiedene Bisindolylbenzochinone aus Ascomyceten isoliert werden (Tabelle 1-3). Im Jahre 1976 folgten Asterrichinon, ein symmetrisch N-1-prenyliertes Derivat aus *A. terreus* (Yamamoto *et al.,* 1976b), und im Jahre 1981 die *O*-methylierten Asterrichinone (AQ) AQ A1 – A4, AQ B1 – B4, AQ C1 und C2 und AQ D aus *A. terreus* var. *africanus* (Arai *et al.,* 1981a). AQ F trägt *O*-Methylgruppen und zwei reguläre Prenylierungen an den Positionen 2 (Arai 1984). *A. terreus* lieferte außerdem Iso- und Neoasterrichinon und ein acetyliertes Asterrichinonderivat (Kaji *et al.,* 1994). Die beiden Cochliodinol-Isomere Isocochliodinol und Neocochliodinol konnten aus *C. murorum* und *C. amygdalisporum* isoliert werden (Sekita 1983). Für Hinnulichinon aus *Nodulisporium hinnuleum* konnte erstmals ein biosynthetischer Ursprung aus Tryptophan und Mevalonat durch Zufütterung radioaktiv markierter Substrate nachgewiesen werden (O'Leary *et al.,* 1984). Mithilfe von Enzymextrakten aus *A. terreus* var. *africanus* konnten Arai und Yamamoto die Bildung von DDAQ D aus Indolpyruvat unter ATP-Verbrauch und die anschließende SAM-abhängige Methylierung zu AQ D beobachten (Arai & Yamamoto 1990). Nach Inkubation von AQ D mit Enzymextrakten in Anwesenheit von DMAPP konnten die einfach, zweifach und dreifach prenylierten Derivate AQ A1 bis AQ C2 erhalten werden. Zusätzliche Derivate, darunter auch das acetylierte AQ SU5500, wurden aus *Aspergillus candidus* isoliert (Alvi *et al.,* 1999). Derivate mit einer zusätzlichen endständigen Doppelbindung am Prenylrest, AQ CT1 und 2, konnten aus *Humicola fuscoatra* bzw. *Botryotrichum* sp. gewonnen werden.

Mit Terrechinon A aus *A. terreus* und Ochrindol D aus *A. ochraceus* konnten zwei Derivate isoliert werden, bei denen eine Hydroxylgruppe des Benzochinons durch eine Dimethylallylfunktion substituiert wurde (De Guzman *et al.,* 1994; He *et al.,* 2004).

Trotz der vielfältigen isolierten Strukturen war die Biosynthese der Bisindolylbenzochinone molekularbiologisch und biochemisch lange Zeit nicht charakterisiert. Die Identifizierung von LaeA als Regulationsprotein der Sekundärmetabolitproduktion in *Aspergillus* sp. (Bok & Keller 2004) führte durch Deletion oder Überexpression in *A. nidulans* zur Entdeckung des stummen *tdi*-Clusters, mit der Produktion von Terrechinon A als Endprodukt (Bok *et al.,* 2006), das bis dahin nur aus *A. terreus* isoliert werden konnte (He *et al.,* 2004). Die fünf beteiligten Gene kodieren für die Proteine TdiABCD und E, bei denen es sich um ein NRPS-ähnliches Protein (TdiA, 1.3.2), eine PTase (TdiB), eine NADH-abhängige Reduktase (TdiC), eine Transaminase (TdiD) und eine putative Methyltransferase (tdiE) handelt, wobei deren Funktionen parallel von zwei Arbeitsgruppen untersucht wurden (Balibar *et al.,* 2007; Schneider *et al.,* 2007; Schneider *et al.,* 2008b). Wie bereits von O'Leary und Co-Autoren aufgezeigt, ist L-Tryptophan eine der Ausgangssubstanzen in der

Biosynthese von Terrechinon A (O'Leary *et al.,* 1984). L-Tryptophan wird zunächst in einer Pyridoxal-5-phosphatabhängigen Aminotransferasereaktion durch TdiD mit Phenylpyruvat als Kosubstrat in Indolpyruvat umgewandelt (Abbildung 1-15). Indolpyruvat wird unter ATP-Verbrauch von TdiA zu DDAQ D dimerisiert. Ab hier unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Arbeitsgruppen. Die Michaeliskonstante von TdiA für Indolpyruvat wurde mit K_M = 1,2 ± 0,3 µM (k_{cat} = 103 ± 4 min^{-1}) (Balibar *et al.,* 2007) bzw. mit K_M = 1,16 ± 0,22 mM (k_{cat} = 69,9 ± 5,33 min^{-1}) (Schneider *et al.,* 2007) bestimmt. Balibar und Co-Autoren erklärten die hohe Affinität von TdiA zu seinem Substrat mit der geringen Stabilität von Indolpyruvat im wässrigen Millieu. DDAQ D wird im Anschluss von TdiC reduziert. Das Intermediat Hydro-DDAQ D konnte durch TdiB ohne Beteiligung von TdiE bereits zu einem Nebenprodukt, *O*-Dimethylallyl-DDAQ D, prenyliert werden, das nicht weiter umgesetzt werden konnte, während im Zusammenspiel mit TdiE die eigentliche Prenylierung am Benzochinonring unter Bildung von Ochrindol D durchgeführt wird (Balibar *et al.,* 2007). Ochrindol D kann wiederum von TdiB alleine zu Terrechinon A prenyliert werden. Dagegen konnten Schneider und Co-Autoren bereits nach Inkubation von DDAQ D und TdiB die Bildung eines Produktes feststellen, das weiter zu Terrechinon A umgesetzt werden konnte (Schneider *et al.,* 2008b). Dieses Zwischenprodukt trägt eine reverse Prenylierung am Indol-C2 und wurde fälschlicherweise als Asterrichinon C1 (AQ C1) bezeichnet. Eine Substanz mit dieser Bezeichnung wurde allerdings bereits isoliert und trägt zusätzlich zur Prenyleinheit an C2 zwei *O*-Methylgruppen am Benzochinonring (CAS: 78723-18-9, Tabelle 1-3) (Arai *et al.,* 1981a). Das betreffende demethylierte Produkt wurde vielmehr auch als AQ C1-1 (CAS: 78860-38-5) bezeichnet (Ono *et al.,* 1991). Für rekombinant hergestelltes TdiC konnte keine Aktivität feststellt werden (Schneider 2009), Schneider und Co-Autoren zogen aus ihren Er-

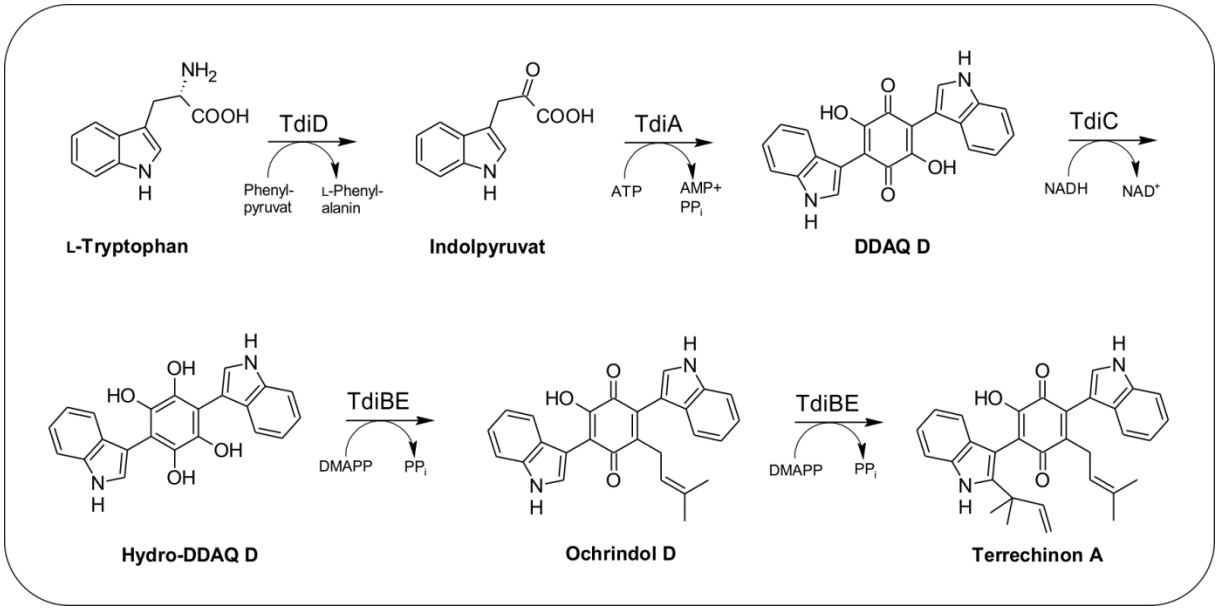


Abbildung 1-15: Schema der Biosynthese von Terrechinon A (modifiziert nach Balibar *et al.,* 2007).

gebnissen aber den Schluss, dass die erste Prenylierung in der Biosynthese von Terrechinon A wahrscheinlich an Position 2 des Indols stattfindet (Schneider *et al.,* 2008b). Terrechinon A als solches konnte von TdiB, C und E nur in einer gemeinsamen Inkubation synthetisiert werden, wobei die Rolle von TdiE weiterhin nicht geklärt ist. Es zeigt eine gewisse Homologie zu SAM-abhängigen Methyltransferasen, in der Biosynthese von Terrechinon A konnte allerdings keine Methylierung festgestellt werden (Balibar *et al.,* 2007).

Terrechinon A zeigte gegenüber verschiedenen humanen Zelllinien mäßige Zytotoxizität (He *et al.,* 2004). Auch Asterrichinon unterdrückte das Wachstum von Tumorzellen, während das *O*-methylierte (AQ A1) und an den Prenyleinheiten hydrogenierte Derivate gänzlich inaktiv waren (Yamamoto *et al.,* 1976a). Spätere Untersuchungen bestätigten, dass die Position der Prenylierung nicht entscheidend für die zytotoxische Aktivität ist (Kaji *et al.,* 1994). Es konnte gezeigt werden, dass der Mechanismus der Zytotoxizität von Asterrichinon auf einer DNA-interkalierenden Wirkung, einem Anhalten des Zellzyklus in der G1-Phase und der Einleitung der Apoptose beruht (Kaji *et al.,* 1997).

Um den Einfluss verschiedener Substituenten an den Positionen 2 und 5 des Benzochinons zu untersuchen, wurden semisynthetische Derivate von Asterrichinon auf ihre Toxizität gegenüber P388-Mausleukämiezellen getestet (Kaji *et al.,* 1998a). Acetylesterderivate (IC_{50} 1,07 bzw. 1,25 µM) zeigten aufgrund einer *in vivo*-Esterspaltung ähnliche Aktivitäten wie Asterrichinon (IC_{50} 1,28 µM), während Dimethylester (IC_{50} >100 µM) nicht gespalten wurden und daher inaktiv verblieben. Monomethylester (IC_{50} 0,74 µM) mit einer freien Hydroxylgruppe waren sogar potenter als Asterrichinon. Ein Derivat mit einer gegen eine Aminogruppe ausgetauschten Hydroxylgruppe (IC_{50} 0,75 µM) zeigte eine ähnliche Potenz. Dies deutet darauf hin, dass mindestens eine freie Hydroxylgruppe am Benzochinonring eine essentielle Bedeutung für die zytotoxische Wirkung hat.

Für DAQ B1 (L-783,281) konnte im Mausmodell eine insulinmimetische Wirkung durch Aktivierung des Insulinrezeptors aufgezeigt werden, während Hinnulichinon (L-767,827), das sich in der Position eines Dimethylallylrests unterscheidet, 100-fach schwächer aktiv war (Roper *et al.,* 2002; Zhang *et al.,* 1999). Dagegen war das symmetrische Hinnulichinon ein deutlich potenterer Inhibitor der HIV-Protease 1 als DAQ B1 (Singh *et al.,* 2004). Kristallographische Analysen machten dabei die Bedeutung der Symmetrie für die Wirkung deutlich. Im Widerspruch dazu stehen Ergebnisse einer anderen Untersuchung, in der ein einfach C-2-revers prenyliertes Derivat von Asterrichinon ähnliche Aktivitäten erreichte wie DDAQ D (Ono *et al.,* 1991). DDAQ D, Isocochliodinol und Semicochliodinol A und B zeigten inhibitorische Aktivität gegenüber der HIV-Protease 1 und der EGFR-PTK (*epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase*), das Vorhandensein einer Dimethylallylfunktion schien dabei nicht entscheidend für die Aktivität zu sein (Fredenhagen *et al.,* 1997). DAQ B1 zeigte darüber hinaus eine Aktivierung aller drei Trk-

Neurotrophinrezeptoren, wobei es an einer intrazellulären Domäne der Rezeptoren, also an einer anderen Stelle angriff als die Neurotrophine (Wilkie *et al.,* 2001). Bei Einwirkung von Konzentrationen von 10 µM traten nach über 48 h toxische Wirkungen auf, sodass die Substanz als Wirkstoff nicht in Frage kommt. DAQ B1 bietet aber als Modellstruktur die Möglichkeit zur Entwicklung niedermolekularer Wirkstoffe für die Therapie von Diabetes und von neurodegenerativen Erkrankungen.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Dissertation sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

Klonierung und Charakterisierung der putativen Prenyltransferasen EAU29429 und EAU39348 aus *A. terreus* und EAQ91749 aus *C. globosum*.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Biosynthese von prenylierten Binsindolyl-benzochinonen in *A. terreus* und *C. globosum*. Folgende Schritten sollten dabei durchgeführt werden:

- Klonierung der codierenden Gensequenzen aus mRNA oder gDNA
- Überproduktion der Proteine in *E. coli* oder *S. cerevisiae*
- Aufreinigung und Charakterisierung der überproduzierten Proteine
- Aufreinigung und Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte

Klonierung und Transformation der putativen NRPS-ähnlichen Proteine EAU31031, EAU36089, EAU36837, EAU36966 und EAU39346 aus *A. terreus* und EAQ90367 und EAQ91752 aus *C. globosum*.

Während dieser Arbeit sollten mehrere Homologe der Bisindolylbenzochinonsynthetase TdiA aus *A. terreus* und *C. globosum* untersucht werden:

- Amplifikation der homologen Gensequenzen aus gDNA von *A. terreus* und *C. globosum*
- Klonierung in den Expressionsvektor pJW24, der *pyrG* als Selektionsmarker trägt
- Transformation von *A. niger* AB1.13
- Selektion, Nachweis und Kultivierung erhaltener Transformanten
- Aufreinigung und Identifizierung der von den Transformanten neu gebildeten Sekundärmetabolite

Zielgerichtete Mutagenese von FtmPT1 zur Identifizierung der am Prenyltransfer beteiligten Aminosäuren.

Zur Unterstützung der Strukturaufklärung von FtmPT1 in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stehle (Universität Tübingen) sollten erste Ergebnisse aus Kristallisations-versuchen dazu genutzt werden, Aminosäuren zu identifizieren, die vermutlich am Prenyl-transfer beteiligt sind. Durch zielgerichtete Mutagenese sollen diese Aminosäuren gegen andere ausgetauscht werden, die zwar eine ähnliche Größe aber unterschiedliche physikochemische Eigenschaften besitzen. Der Einfluss dieser Veränderungen sollte untersucht werden:

- Analyse des aktiven Zentrums von FtmPT1
- Einführung von gezielten Mutationen zum Austausch einzelner Aminosäuren im aktiven Zentrum von FtmPT1 durch PCR
- Überproduktion der mutierten Proteine in *E. coli*
- Aufreinigung und Charakterisierung der mutierten Proteine bezüglich ihrer Aktivität und Substratspezifität

Zielgerichtete Mutagenese von Prenyltransferasen zur Änderung der Substrat- und Regiospezifität.

Bereits hergestellte mutierte Derivate von FtmPT1 sollten auf Änderungen ihrer Substrat- und Regiospezifität untersucht werden. Die erhaltenen Ergebnisse sollten auf anderen PTasen wie CdpC3PT und CTrpPT übertragen und angewendet werden:

- Untersuchung der mutierten Derivate von FtmPT1
- Aufreinigung und Identifizierung möglicher neuer Produkte
- Sequenzvergleich von CdpC3PT, CTrpPT
- Einführung von Mutationen zum Austausch einzelner oder mehrerer Aminosäuren im aktiven Zentrum von CdpC3PT und CTrpPT durch PCR
- Überproduktion der mutierten Proteine in *E. coli*
- Aufreinigung und Charakterisierung der mutierten Proteine bezüglich ihrer Aktivität, Substrat- und Regiospezifität

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien, Geräte, Säulenmaterialien und Enzyme

2.1.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Die für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden hauptsächlich von den Firmen Alfa Aesar (Karlsruhe), Fluka (jetzt: Sigma-Aldrich, Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich und VWR (Darmstadt) bezogen. Fließmittel und Lösungmittel wurden von den Firmen Acros Organics (jetzt: Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), Fisher Scientific (Schwerte), Roth und VWR erworben. Antibiotika und der Selektionsmarker Uridin wurden von den Firmen Roth und Sigma-Aldrich bezogen. Nährmedienbestandteile stammten hauptsächlich von den Firmen BD (Heidelberg) und AppliChem (Darmstadt).

Asterrichinon D (AQ D), Brevianamid F, DMAPP, Hydroxyxanthonderivate und Terphenylderivate wurden von Frau Lena Ludwig, *cyclo*-D-Trp-L-Pro von Frau Dr. Beate Wollinsky, GPP und FPP von Frau Dr. Edyta Stec synthetisiert und zur Verfügung gestellt. AQ D wurde dabei über drei Schritte aus 2,5-Dichlorbenzochinon und Indol synthetisiert (Pirrung *et al.,* 2002; Pirrung *et al.,* 2005; Tanoue *et al.,* 2008). DMAPP und FPP wurden analog der Methode zur Synthese von GPP hergestellt (Woodside *et al.,* 1988). Hydroxyxanthonderivate wurden aus den entsprechenden Hydroxybenzoesäurederivaten und Phloroglucin bzw. Methylhydrochinon (Grover *et al.,* 1955) hergestellt.

Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße, Pipettenspitzen und Einmalküvetten wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

Tabelle 2-1: Spezielle Chemikalien und Medienbestandteile.

Bezeichnung	Hersteller
Bovines Serumalbumin (BSA)	Merck, Darmstadt
Coomassie Brilliant Blau G-250	Serva, Heidelberg
Coomassie Brilliant Blau R-250	Serva, Heidelberg
5-Fluororotsäure (5-FOA)	Thermo Scientific Fermentas, Schwerte
Lösungsmittel für die NMR-Spektroskopie:	Euriso-Top, Saarbrücken
Aceton-D_6, 99,80% D	
Chloroform-D, 99,80% D	
DMSO-D_6, 99,80% D	
Methanol-D_4, 99,80% D	
Natriumdesoxycholat	Roth, Karlsruhe
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) (30% Acrylamidstammlösung mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
SYBR® Safe DNA Gel Stain (10000x in DMSO)	Life Technologies, Darmstadt
Tween® 20	Roth, Karlsruhe

2.1.2. Geräte

Tabelle 2-2: Verwendete Geräte.

Bezeichnung	Hersteller
AccuBlock™ Digital Dry Bath Heizblock	Labnet, Edison, NJ, USA
ÄKTAprime™ plus	GE Healthcare, Freiburg
mit dem 2-Channel-Rekorder LKB 2210	LKB-Produkter AB, Bromma, Schweden
Autoklav VX-150	Systec, Wettenberg
Brutschrank EB 280	Jouan, jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ecotron Schüttelinkubator	Infors HT, Bottmingen, Schweiz
Einkanalpipetten Discovery	Abimed, Langenfeld
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Biosciences
Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-2 LD Plus	Martin Christ, Osterode am Harz
Heraeus Fresco 17 Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Multifuge 1 L-R Zentrifuge	Heraeus, jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
ImageQuant 100 Geldokumentationssystem	GE Healthcare, Freiburg
Kamera SP-500 UZ mit aufgesetztem UV-Filter	Olympus, Tokio, Japan
Labcycler compact silver	biolab*products*, Bebensee
Membranpumpen	Vacuubrand, Wertheim
MicroStar 17 Zentrifuge	VWR, Darmstadt
Mikrowelle	Privileg, Stuttgart
Mini-PROTEAN® 3 Elektrophorese-Zelle	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
MJ Mini Personal Thermal Cycler	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
NanoDrop 2000c	Peqlab, jetzt Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
pH 211 Microprocessor pH Meter	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Rotavapor-R Rotationsverdampfer mit angeschlossener Membranpumpe	Büchi, Flawil, Schweiz
Sonifier 250	Branson Ultrasonics, Danbury, CT, USA
Sorvall RC 6+ Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Spannungsgeber LKB GPS 200/400	Pharmacia
Scotsman AF 100 Eisbereiter	Hubbard Ice Systems, Ipswich, Großbritannien
Sonorex RK 100 Ultraschallbad	Bandelin, Berlin
Transilluminator	Rothhaar & Schroeder, Heidelberg
Univapo 100 H Vakuumzentrifuge mit angeschlossener Membranpumpe	UniEquip, Martinsried

2.1.3. Materialien zur Chromatographie

Materialien zur Chromatographie wurden als Trockensubstanzen, Suspensionen oder als Fertigsäulen bzw. Fertigplatten vom jeweiligen Hersteller bezogen. Die Lagerung der Säulenmaterialien erfolgte nach Anweisungen der Hersteller.

Tabelle 2-3: Verwendetes Chromatographiematerial.

Bezeichnung	Hersteller
Glutathione Sepharose	GE Healthcare, Freiburg
HiLoad 16/60 Superdex 200 (Fertigsäule)	GE Healthcare, Freiburg
HisPur™ Cobalt Resin (Suspension)	Pierce Biotechnology, jetztThermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Multospher RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 × 4 mm)	C&S Chromatographie Service, Langerwehe
Multospher 120 RP 18-5 (Fertigsäule, 5 µm, 250 × 10 mm)	C&S Chromatographie Service, Langerwehe
Multoprep RP-18 (Füllmaterial, Partikelgröße 5 µm)	C&S Chromatographie Service, Langerwehe
Protino Ni-NTA Agarose (Suspension)	Macherey Nagel, Düren
Sephadex G-25 PD-10, NAP-5 (Fertigsäulen)	GE Healthcare, Freiburg

2.1.4. Enzyme und Kits

Tabelle 2-4: Enzyme, Größenstandards und Kits.

Bezeichnung	Hersteller
DNase I	AppliChem (Darmstadt)
E.Z.N.A.™ Fungal RNA Miniprep Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche Applied Science, Mannheim
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Thermo Scientific Fermentas, Schwerte
HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit	SLG Südlaborbedarf, Gauting
LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis	GE-Healthcare, Freiburg
HMW and LMW Gel Filtration Calibration Kit	GE-Healthcare, Freiburg
Lysing enzyme aus *Trichoderma harzianum*	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysozym (81989 U/mg)	Fluka, Ulm
pGEM®-T easy Vector system	Promega, Mannheim
Restriktionsendonukleasen	Jena Bioscience, Jena Thermo Scientific Fermentas, Schwerte
RNase A	Roth, Karlsruhe
Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP)	Thermo Scientific Fermentas, Schwerte
S. c. EasyComp™ Transformation Kit	Invitrogen, jetzt Life Technologies, Darmstadt
T4-DNA Ligase	Jena Bioscience, Jena
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche Applied Science, Mannheim

2.2. Bakterienstämme, Pilzstämme, Plasmide und PCR-Primer

2.2.1. Bakterienstämme

Tabelle 2-5: Verwendete Bakterienstämme.

Bezeichnung	Genotyp	Hersteller
E. coli ArcticExpress (DE3) RIL	F^- *ompT hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*$^+$ Tet^r *gal* λ(DE3) *endA* Hte [*cpn10 cpn60* Gent^r] [*argU ileY leuW* Str^r]	Stratagene, Amsterdam
E. coli ArcticExpress RIL	F- *ompT hsdS*(r_B^- m_B^-) *dcm*$^+$ Tet^r *gal endA* Hte [*cpn10 cpn60* Gent^r] [*argU ileY leuW* Str^r]	Stratagene, Amsterdam
E. coli BL21 (DE3) pLysS	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam^R)	Novagen, Darmstadt
E. coli XL1-Blue MRF‘	Δ(*mcrA*)*183* Δ(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)*173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI*^{q}*ZΔM15 Tn10 (Tet*^{r}*)]*	Stratagene, Amsterdam
E. coli M15 [pREP4]	*nal*^{S}*, str*^{S}*, rif*^{S}*, thi*$^-$*, lac*$^-$*, ara*$^+$*, gal*$^+$*, mtl*$^-$,F^-*, recA*$^+$*, uvr*$^+$*, lon*$^+$	Qiagen, Hilden
E. coli Rosetta 2 (DE3) pLysS	F^- *ompT hsdS*$_B$(r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3) pLysSpRARE2 (Cam^R)	Novagen, Darmstadt
E. coli SG13009 [pREP4]	*nal*^{S}*, str*^{S}*, rif*^{S}*, thi*$^-$*, lac*$^-$*, ara*$^+$*, gal*$^+$*, mtl*$^-$,F^-*, recA*$^+$*, uvr*$^+$*, lon*$^+$	Qiagen, Hilden
E. coli SoluBL21™	F^- *ompT hsd*S_B (r_B^- m_B^-) *gal dcm* (DE3)*	AMS Biotechnology, Abingdon, Großbritannien

* Der Stamm ist ein Derivat von BL21(DE3) und enthält laut Herstellerangaben uncharakterisierte Mutationen, die durch spezielle Selektionskriterien erhalten wurden und den Stamm befähigen sollen, unlösliche Proteine vollständig oder teilweise in löslicher Form zu exprimieren.

2.2.2. Pilzstämme

Tabelle 2-6: Verwendete Pilzstämme.

Bezeichnung	Beschreibung	Hersteller/Referenz
A. niger AB1.13	UV-induzierter Mutant von *A. niger* AB 4.1, *cspA1 prt-13 pyrG1*	(Mattern *et al.,* 1992)
A. terreus FGSC A1156	Wildtyp, sequenziert	FGSC, Kansas City, KS, USA
A. terreus DSM 1958	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
C. globosum DSM 1962	Wildtyp, sequenziert	DSMZ, Braunschweig
C. globosum DSM 62110	Wildtyp	DSMZ, Braunschweig
C. globosum NRRL 1870	Wildtyp	NRRL, Peoria, Il, USA
S. cerevisiae INVSc1	MATa *his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52*/MATα *his3Δ1 leu2 trp1-289 ura3-52*	Invitrogen, jetzt Life Technologies, Darmstadt

2.2.3. Plasmide

Tabelle 2-7: Kommerziell erworbene Klonierungs- und Expressionsvektoren.

Bezeichnung	Beschreibung*	Hersteller
pGEM®-T easy	Linearisierter Vektor mit T-Überhang zur Klonierung von PCR-Produkten mit A-Überhang, *lacZ*, *ori*, *f1 ori*, Amp^R	Promega, Mannheim
pGEX-4T-1	Expressionsvektor für *E. coli*, Amp^R, T5-Promotor, Sequenz für N-terminalen GST-*tag*	GE-Healthcare, Freiburg
pQE-70	Expressionsvektor für *E. coli*, Amp^R, T5-Promotor, Sequenz für C-terminalen His_6-*tag*	Qiagen, Hilden
pYES2/NT C	Expressionsvektor für *S. cerevisiae*, Amp^R, *GAL1*-Promotor, Sequenz für N- oder C-terminalen His_6-*tag*	Invitrogen, jetzt Life Technologies, Darmstadt

* Amp^R codiert für eine β-Laktamase, die zu einer Resistenz gegenüber β-Laktamantibiotika wie Ampicillin oder Carbenicillin führt. Aufgrund der besseren Stabilität wurde ausschließlich Carbenicillin eingesetzt.

Tabelle 2-8: Verwendete Plasmide.

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
pAG12	Expressionskonstrukt von *ftmPT1* aus *A. fumigatus* für *E. coli*, basierend auf pQE-70	(Grundmann & Li 2005)
pDP008	Expressionskonstrukt von *xptB* aus *A. nidulans* für *E. coli*, basierend auf pQE-60	(Pockrandt *et al.,* 2012)
pHIS8	Expressionsvektor für *E. coli*, basierend auf pET-28a(+), T7-Promotor, Kan^R, Sequenz für N-terminalen His_8-*tag* und C-terminalen His_6-*tag*	(Jez *et al.,* 2000)
pHX21	Expressionskonstrukt von *cTrpPT aus A. oryzae* DSM1147 für *E. coli*, basierend auf pQE-70	(Zou *et al.,* 2010)
pJW24	Vektor zur Transformation von *pyrG* Aspergillus-Stämmen, basierend auf pBlueScript SK(-),Amp^R, enthält *pyrG* aus *A. parasiticus*	(Calvo *et al.,* 2004)
pPS1	Expressionskonstrukt von *tdiB* aus *A. nidulans* für *E coli*, basierend auf pET-28b	(Schneider *et al.,* 2008b)
pWY25	Expressionskonstrukt von *cdpC3PT aus N. fischeri* für *E. coli*, basierend auf pQE-60	(Yin *et al.,* 2010)

Tabelle 2-9: Im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Plasmide. Verwendete Primer sind in Tabelle 2-10 aufgelistet.

Bezeichnung	Beschreibung
pST1	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_E102Q* (G304C), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_E102Q_for und rev)
pST2	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_G115T* (G343A und G344C), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_G115T_for und rev)
pST3	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_Y205F* (A614T), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_Y205F_for und rev)
pST4	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_H279F* (C835T und A836T), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_H279F_for und rev)
pST5	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_G115T_H279R* (G343A, G344C und A836G), erhalten durch Mutagenese von pST2 (Primer: FtmPT1_H279R_for und rev)
pST6	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_G115T_L187K_H279R* (G343A, G344C, C559A, T560A, C561G und A836G), erhalten durch Mutagenese von pST5 (Primer: FtmPT1_L187K_for und rev)
pST7	Klonierungskonstrukt für *CHGG_03684*, PCR amplifiziertes Fragment (1429 bp), aus gDNA von *C. globosum* NRRL 1870), entsprechend NT_165977.1: bp 4968089 – bp 4969501, in pGEM®-T easy, mit Schnittstellen für BamHI und NotI (Primer: CHGG_03684_for und rev_1)
pST8	Klonierungskonstrukt für *CHGG_03684*, PCR amplifiziertes Fragment (1429 bp), aus gDNA von *C. globosum* DSM 62110), entsprechend NT_165977.1: bp 4968089 – bp 4969501, in pGEM®-T easy, mit Schnittstellen für BamHI und NotI (Primer: CHGG_03684_for und rev_1)
pST9	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_G115A* (G344C), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_G115A_for und rev)
pST10	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_G115I* (G343A, G344T und G345A), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_G115I_for und rev)
pST11	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_G115L* (G343C und G344T), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_G115L_for und rev)
pST12	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_L187A* (C559G und T560C), erhalten durch Mutagenese von pAG12 (Primer: FtmPT1_L187A_for und rev)
pST13	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_L187A_Y205F* (C559G, T560C und A614T), erhalten durch Mutagenese von pST12 (Primer: FtmPT1_Y205F_for und rev)
pST14	Klonierungskonstrukt für *CHGG_03684* (EAQ91749), durch Fusions-PCR amplifiziertes Fragment mit Schnittstellen für BamHI und BglII (1218 bp), aus gDNA von *C. globosum* DSM 1962: NT_165977.1: bp 4969501 – bp 4968819 (Exon 1), bp 4968662 – bp 4968276 (Exon 2), bp 4968224 – bp 4968089 (Exon 3), in pGEM®-T easy (Primer: CHGG_03684_for und rev_2)
pST15	Expressionskonstrukt für *cdpC3PT_A115G* (C344G), erhalten durch Mutagenese von pWY25 (Primer: CdpC3PT_A115G_for und rev)
pST16	Expressionskonstrukt für *ftmPT1_G115A_L187A_Y205F* (G344C, C559G, T560C und A614T), erhalten durch Mutagenese von pST13 (Primer: FtmPT1_G115A_for und rev)
pST17	Expressionskonstrukt für *cdpC3PT_A115T* (G343A), erhalten durch Mutagenese von pWY25 (Primer: CdpC3PT_A115T_for)
pST18	Expressionskonstrukt für *CHGG_03684*, BamHI-BglII Fragment (1212 bp) aus pST14, kloniert in pQE-70
pST19	Klonierungskonstrukt für *CHGG_03684*, durch Fusions-PCR amplifiziertes Fragment mit Schnittstellen für BamHI und NotI (1223 bp), aus gDNA von *C. globosum* DSM 1962: NT_165977.1: bp 4969501 – bp 4968819 (Exon 1), bp 4968662 – bp 4968276 (Exon 2), bp 4968224 – bp 4968089 (Exon 3), in pGEM®-T easy (Primer: CHGG_03684_for und rev_1)
pST20	Expressionskonstrukt für *CHGG_03684*, BamHI-NotI Fragment (1223 bp) aus pST19, kloniert in pHIS8
pST21	Expressionskonstrukt für *CHGG_03684*, BamHI-NotI Fragment (1223 bp) aus pST19 kloniert in pYES2/NT C
pST22	Klonierungskonstrukt für *ATEG_09980* (EAU29429, AstPT), durch Fusions-PCR amplifiziertes Fragment mit Schnittstellen für BamHI und BglII (1290 bp), aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958: NT_165939.1: bp 110923 – bp 111590 (Exon 1), bp 111659 – bp 112129 (Exon 2), bp 112204 – bp 112339 (Exon 3), in pGEM®-T easy (Primer: ATEG_09980_1 und 6)
pST23	Expressionskonstrukt für *ATEG_09980*, BamHI-BglII Fragment (1281 bp) aus pST22, kloniert in pQE-70

Bezeichnung	Beschreibung
pST24	Expressionskonstrukt für *ATEG_09980*, BamHI-BglII Fragment (1281bp) aus pST22, kloniert in pQE-70
pST25	Expressionskonstrukt für *ATEG_09980*, BamHI-BglII Fragment (1281bp) aus pST22, kloniert in pQE-70
pST26	Klonierungskonstrukt für *CHGG_03687* (EAQ91752) mit eigener Promotor- und Terminator-sequenz (3849 bp), mit Schnittstellen für NotI und SacII, aus gDNA von *C. globosum* NRRL 1870: entsprechend NT_165977.1: bp 4976018 – bp 4979868, in pGEM®-T easy (Primer: CHGG_03687_for und rev)
pST27	Klonierungskonstrukt für *CHGG_03687* (EAQ91752) mit eigener Promotor- und Terminator-sequenz (3849 bp), mit Schnittstellen für NotI und SacII, aus gDNA von *C. globosum* DSM 62110: entsprechend NT_165977.1: bp 4976018 – bp 4979868, in pGEM®-T easy (Primer: CHGG_03687_for und rev)
pST28	Transformationskonstrukt für *CHGG_03687* mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz, SacII-Fragment (3849 bp) aus pST26, kloniert in pJW24
pST30	Klonierungskonstrukt für *ATEG_03563* (EAU36837) mit eigener Promotor- und Terminator-sequenz (3786 bp), mit Schnittstellen für BamHI und NotI aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958, NT_165927.1: bp 2152361 – bp 2156138, in pGEM®-T easy (Primer: ATEG_03563_for und rev)
pST31	Klonierungskonstrukt für *ATEG_08899* (EAU31031) mit eigener Promotor- und Terminator-sequenz (3789 bp), mit Schnittstellen für XbaI und NotI aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958, NT_165936.1: bp 1123667 – bp 1127447, in pGEM®-T easy (Primer: ATEG_08899_for und rev)
pST32	Klonierungskonstrukt für *ATEG_02004* (EAU36966) mit eigener Promotor- und Terminator-sequenz (3448 bp), mit Schnittstellen für SpeI und SacII aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958, NT_165926.1: bp 327756 – bp 331197, in pGEM®-T easy (Primer: ATEG_02004_for und rev)
pST33	Transformationskonstrukt für *ATEG_03563* mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz, BamHI-NotI Fragment (3679 bp) aus pST30, kloniert in pJW24
pST34	Expressionskonstrukt für *CHGG_03684*, BamHI-NotI Fragment (1212 bp) aus pST19, kloniert in pGEX-4T-1
pST35	Klonierungskonstrukt für *ATEG_00702* (EAU39348), durch Fusions-PCR amplifiziertes Fragment mit Schnittstellen für BamHI und NotI (1289 bp), aus gDNA von *A. terreus* FGSC A1156: NT_165972.1: bp 1975238 – bp 1974574 (Exon 1), bp 1974509 – bp 1974036 (Exon 2), bp 1973965 – bp 1973830 (Exon 3), in pGEM®-T easy (Primer: ATEG00702_1_pHIS und 6_pHIS)
pST36	Expressionskonstrukt für *CHGG_03684_C1206G*, erhalten durch Mutagenese von pST18, enthält zurückmutiertes Stopcodon und dient damit der Expression ohne His_6-*tag* (Primer: 03684_C1206G_for und rev)
pST37	Expressionskonstrukt für *ATEG_00702*, BamHI-NotI Fragment (1282 bp) aus pST35, kloniert in pHIS8
pST38	Transformationskonstrukt für *ATEG_02004* mit eigener Promotor- und Terminatorsequenz, SpeI-SacII Fragment (3445 bp) aus pST32, kloniert in pJW24

2.2.4. PCR-Primer

Alle Primer wurden von Eurofins MWG GmbH (Ebersberg) synthetisiert und nach Erhalt jeweils in der angegebenen Menge Wasser gelöst (Endkonzentration 100 pmol/µl), anschließend 1:10 verdünnt und als 100 µl Aliquots bei -20 °C gelagert.

Tabelle 2-10: Oligonukleotide, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden. Unterstrichene Basen markieren eingeführte Restriktionsschnittstellen, fette Buchstaben entsprechen veränderten Basen. Kursive Bereiche in Fusionsprimern bezeichnen die überlappenden Sequenzen.

Bezeichnung	Sequenz (5‘ → 3‘)	Bemerkungen
FtmPT1_E102Q_for	GTTGCCCATC**C**AGTTCAGCAACAACGTCG	GAG → **C**AG
FtmPT1_E102Q_rev	GTTGCTGAACT**G**GATGGGCAACCCGGTAAG	
FtmPT1_G115T_for	GATTCGAATT**AC**GGTTGATCCCGTCACGGCTGACTCTGGC	GGG → **AC**G
FtmPT1_G115T_rev	GGGATCAACC**GT**AATTCGAATCAACGCCCGAGCGACG	

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Bemerkungen
FtmPT1_Y205F_for	GCGTATTTCTT**T**CCCGCAGCCCAAATCTGC	TAC → T**T**C
FtmPT1_Y205F_rev	GGGCTGCGGG**A**AGAAATACGCCTTGACCAG	
FtmPT1_H279F_for	GTTCTTCCCT**TT**TTTCCTGTCCACCGACCTCGTCGAACC	CAT → **TT**T
FtmPT1_H279F_rev	GGACAGGAAA**AA**AGGGAAGAACGAACACGCGTCGAACGCC	
FtmPT1_H279R_for	GTTCTTCCCTC**G**TTTCCTGTCCACCGACCTC	CAT → C**G**T
FtmPT1_H279R_rev	GGACAGGAAA**C**GAGGGAAGAACGAACACGCG	
FtmPT1_L187K_for	GAAATCGCAGATC**AAG**ACCGCCATGGACCTGCAGAAATCCGGG	CTC → **AAG**
FtmPT1_L187K_rev	CCATGGCGGT**CTT**GATCTGCGATTTCCAGGGGCTCC	
FtmPT1_G115I_for	GATTCGAATT**ATA**GTTGATCCCGTCACGGCTGACTCTGGCACCG	GGG → **ATA**
FtmPT1_G115I_rev	GGGATCAAC**TAT**AATTCGAATCAACGCCCGAGCGACGTTGTTGC	
FtmPT1_G115L_for	GATTCGAATT**CT**GGTTGATCCCGTCACGGCTGACTCTGGC	GGG → **CT**G
FtmPT1_G115L_rev	GGGATCAACC**AG**AATTCGAATCAACGCCCGAGCGACG	
FtmPT1_G115A_for	GATTCGAATTG**C**GGTTGATCCCGTCACGGCTGACTC	GGG → G**C**G
FtmPT1_G115A_rev	GGGATCAACC**G**CAATTCGAATCAACGCCCGAGCG	
FtmPT1_L187A_for	GAAATCGCAGATC**GC**CACCGCCATGGACCTGCAGAAATC	CTC → **GC**C
FtmPT1_L187A_rev	CCATGGCGGTG**GC**GATCTGCGATTTCCAGGGG	
CdpC3PT_A115G_for	GCTCGGCTCG**G**CTTCGAGCCCACGAGTTATC	GCC → G**G**C
CdpC3PT_A115G_rev	CTCGAAG**C**CGAGCCGAGCCGTTGAGCCGAG	
CdpC3PT_A115T_for	GCTCGGCTC**A**CCTTCGAGCCCACGAGTTATC	GCC → **A**CC
CdpC3PT_A115T_rev	CTCGAAGG**T**GAGCCGAGCCGTTGAGCCGAG	
CTrpPT_G117T_for	CCGGAAAGACTGTACGAATG**AC**CTTCGAGCCGACAACATTCATTGC	GGC → **AC**C
CTrpPT_G117T_rev	GTCGGCTCGAAG**GT**CATTCGTACAGTCTTTCCGGTCTTTGTAAAG	
ATEG00702_1_pHIS	GGA**TC**CATGACCATCCACGCCAAACACC	BamHI-Schnittstelle
ATEG_00702_2	*GCGTGGTGGATGTGATCCAG*GCTTCGAGCACGTCGACGGC	überlappt mit Exon 2
ATEG_00702_3	*GCCGTCGACGTGCTCGAAGC*CTGGATCACATCCACCACGC	überlappt mit Exon 1
ATEG_00702_4	*CATACTCCTTTCCCTTACCG*AAAGTCTCCTCCATCGTCCGCCG	überlappt mit Exon 3
ATEG_00702_5	*CGGACGATGGAGGAGACTTT*CGGTAAGGGAAAGGAGTATGGGC	überlappt mit Exon 2
ATEG00702_6_pHIS	GC**GG**C**C**GCCTAGACGTAGTCTCCCAAAAGC	NotI-Schnittstelle
ATEG_09980_1	**GGAT**CCATGACTATCCACACCGACCTACCGCCCCC	BamHI-Schnittstelle
ATEG_09980_2	*TGCGGGCTCGCCGCGATCCAT*GCTTCTACCATGTCGATGG	überlappt mit Exon 2
ATEG_09980_3	*ATCGACATGGTAGAAGC*ATGGATCGCGGCGAGCCCGCACG	überlappt mit Exon 1
ATEG_09980_4	*CGTACGAATTTCCCTTGCCA*AATGTCATCTCCATGGCCTGCCGG	überlappt mit Exon 3
ATEG_09980_5	*CAGGCCATGGAGATGACATT*TGGCAAGGGAAATTCGTACG	überlappt mit Exon 2
ATEG_09980_6	CCTAG**AT**C**TG**TACACGTAATCTCCTGTAAACGCATGCGCCGG	BglII-Schnittstelle, mutiertes Stopcodon
CHGG_03684_for	C**GGAT**CCATGGCGACCGTTGACACC	BamHI-Schnittstelle
CHGG_03684_rev_1	G**GC**G**G**CC**GC**CTAAGTATACTTCCAGTTACC	NotI-Schnittstelle
CHGG_03684_rev_2	C**AGATCT**G**T**AAGTATACTTCCAGTTACC	BglII-Schnittstelle, mutiertes Stopcodon
CHGG_03684_fus_1	*CTAGCCACGGCGAAGGCATTG*TCCGCAACGACATCGAGGCCGGGC	überlappt mit Exon 2
CHGG_03684_fus_2	*GCCCGGCCTCGATGTCGTTGCGGA*CAATGCCTTCGCCGTGGCTAG	überlappt mit Exon 1
CHGG_03684_fus_3	*CGAGACCCGGTTTTGGCCG*TGTGCAGCCTTGACGGCCTC	überlappt mit Exon 3
CHGG_03684_fus_4	*CGAGGCCGTCAAGGCTGCACA*CGGCCAAAACCGGGTCTCGCC	überlappt mit Exon 2
03684_C1206G_for	CTGGAAGTATACTTA**G**AGATCTCATCACCATCACCATCAC	Rückmutation des Stop-Codons zur Expression ohne His_6-*tag*
03684_C1206G_rev	GATGAGATCT**C**TAAGTATACTTCCAGTTACCCGCCTTC	
CHGG_02302_for	CA**CT**A**G**TTTTGGTCACCGAACGATATCTCG	SpeI-Schnittstelle
CHGG_02302_rev	GTCT**AGA**TGTACTAACAAGAAGAATGCAAGTGTGC	XbaI-Schnittstelle

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Bemerkungen
CHGG_03687_for	**GC**GG**CCGC**GGCCAGCCCACAGGCATACTAACC	NotI-Schnittstelle
CHGG_03687_rev	CC**GCGG**GCACCCAATCACTGTCAACTACCTTGCCACTGC	SacII-Schnittstelle
ATEG_00700_for	C**ACT**AGTTCGCAATGTCTTTCTGCTGTTG	SpeI-Schnittstelle
ATEG_00700_rev	**TC**TAGATACTCTTACACTTCACACCACTCACACC	XbaI-Schnittstelle
ATEG_02004_for	ACT**AGT**TGTAATCCCTGCTCGCGATAGCAAGATTG	SpeI-Schnittstelle
ATEG_02004_rev	**CC**G**CGG**AAAGATTTACTTAACGCGAGTCTCACAATC	SacII-Schnittstelle
ATEG_02815_for	ACT**AG**TCTTCATTTATTCCTGGTTGAGGGGGG	SpeI-Schnittstelle
ATEG_02815_rev	**GC**GGCC**GC**AATCCCATGTCTGAAAGTTTC	NotI-Schnittstelle
ATEG_03563_for	**GGAT**CCTCTGGAATTGCAAAGTCTAAC	BamHI-Schnittstelle
ATEG_03563_rev	**GCGGCCGC**TCTACCTCATCTCTGAGAGCTGTC	NotI-Schnittstelle
ATEG_08899_for	**TC**TAGATTAACATAAATATGAACCTTTCTCATAGTCATAC	XbaI-Schnittstelle
ATEG_08899_rev	G**CGG**C**C**GCTTTTGGCAGGTGCCTTTTGATAG	NotI-Schnittstelle

2.3. Nährmedien, Antibiotika und Lösungen

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle wässrigen Lösungen mit demineralisiertem Wasser hergestellt, vor der Verwendung 20 min bei 121 °C und 2 bar im Autoklaven sterilisiert und bei Raumtemperatur gelagert.

2.3.1. Wasser

Leitungswasser wurde durch eine BioQuell Wasserenthärtungsanlage (Judo, Winnenden) und eine Milli-RX 20 (jetzt Merck Millipore, Billerica, MA, USA) entsalzt und gereinigt. Vollentsalztes Wasser wurde in der Bidestillationsanlage Bi 18 E aus Quarzglas (QCS, Maintal) zweifach destilliert und anschließend in Braunglasflaschen gelagert. Bidestilliertes Wasser wurde vor der Anwendung als HPLC-Fließmittel über einen Membranfilter (47 mm, 0,2 µm, Pall, Port Washington, NY, USA) filtriert.

2.3.2. Nährmedien

Die verwendeten Nährmedien wurden vor der Verwendung autoklaviert. Für Festmedien wurden 1,5-2,0% (m/v) Agar zugesetzt. Antibiotika und andere hitzelabile Zusätze wurden mit einem Spritzenfilter (Filtropur S 0,2, Porengröße 0,2 µm, Sarstedt, Nümbrecht) steril filtriert und nach der Sterilisation zugegeben. Größere Volumina von Kohlenhydratlösungen für Medien für *S. cerevisiae* wurden über eine Millipore Express™ PLUS Membranfiltereinheit mit 0,22 µm Filterporengröße (Merck Millipore) filtriert.

Tabelle 2-11: Verwendete Nährmedien für Bakterien.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Volumen/ Menge	Bemerkungen
LB	Trypton Hefeextrakt NaCl	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (w/v)	pH 7,0 mit NaOH einstellen

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Volumen/ Menge	Bemerkungen
LB-Platten zur Blau-Weiß-Selektion	1 M IPTG 2% (w/v) X-Gal (in DMF) Wasser	10 µl 40 µl 150 µl	Steril mischen und jeweils auf einer LB-Agar-Platte verstreichen und DMF verdunsten lassen
M9 Minimalmedium (M9)	10x M9-Salze $CaCl_2$ $MgSO_4$ Glycerol	10% (v/v) 100 µM 1 mM 0,3% (v/v)	Mg^{2+}- Lösung wurde nach dem Autoklavieren steril zugesetzt
10x M9-Salze	NH_4Cl NaCl $Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$ KH_2PO_4 Wasser	10 g 5 g 60 g 30 g ad 1000 ml	
SOC	Trypton Hefeextrakt NaCl KCl Mg^{2+} Glucose	2% (w/v) 0,5% (w/v) 10 mM 2,5 mM 20 mM 20 mM	Mg^{2+}- und Glucoselösungen wurden nach dem Autoklavieren steril zugesetzt, das Medium aliquotiert und bei -20 °C gelagert.
2 M Mg^{2+}-Lösung	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$ $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	1 M 1 M	
TB	Trypton Hefeextrakt Glycerol Wasser	12% (w/v) 24% (w/v) 0,4% (v/v) ad 900 ml	Nach dem Autoklavieren 100 ml TB-Puffer steril zugeben
TB-Puffer	KH_2PO_4 K_2HPO_4	0.17 M 0.72 M	

Tabelle 2-12: Verwendete Nährmedien für Pilze.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
Czapek-Dox mit Hefeextrakt (CDH)	Czapek-Dox Hefeextrakt	3,5% (w/v) 0,5% (w/v)	
Malzextrakt-Pepton-Medium (MEP)	Malzextrakt Pepton	3% (w/v) 0,3% (w/v)	
Potato-Dextrose-Medium (PD)	Potato Dextrose	2,4% (w/v)	
HME	Malzextrakt Hefeextrakt Glucose	1% (w/v) 0,4% (w/v) 0,4% (w/v)	
HPD	Hefeextrakt Pepton Dextrose	1% (w/v) 2% (w/v) 2% (w/v)	Zugabe von steriler Dextroselösung nach dem Autoklavieren (nach Herstelleranweisung von Invitrogen)

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
SC-U Minimalmedium	Yeast Nitrogen Base (mit Ammoniumsulfat, ohne Aminosäuren)	6,7 g	Nach dem Autoklavieren wurden zusätzlich steril zugesetzt:
	Adenin, L-Arginin, L-Cystein, L-Leucin, L-Lysin, L-Threonin, L-Tryptophan	je 0,1 g	für Vorkulturen 100 ml 20% Glucose und 100 ml Wasser,
	L-Asparaginsäure, L-Histidin, L-Isoleucin, L-Methionin, L-Phenylalanin, L-Prolin, L-Serin, L-Tyrosin, L-Valin	je 0,05 g	zur Induktion 100 ml 20% Galactose und 100 ml 10% Raffinose (nach Herstelleranweisung von Invitrogen)
	Wasser	ad 800 ml	

2.3.3. Antibiotika

Die eingesetzten Antibiotika wurden im angegebenen Lösungsmittel (Tabelle 2-13) gelöst. Wässrige Lösungen wurden mit einem Spritzenfilter (Filtropur S 0,2) steril filtriert. Die Lagerung erfolgte in Aliquots bei -20 °C. Antibiotika wurden den Nährmedien (2.3.2) nach der Sterilisation zugesetzt, den Flüssigmedien kurz vor Gebrauch und den Festmedien nach Abkühlen auf ca. 50 °C.

Tabelle 2-13: Verwendete Antibiotikalösungen.

Antibiotikum	Konzentration		Lösungsmittel
	Stammlösung [mg/ml]	Endkonzentration [µg/ml]	
Carbenicillin	50	50	Wasser
Chloramphenicol	50	12,5	Ethanol
Gentamycin	20	20	Wasser
Kanamycin	50	50	Wasser
Tetracyclin	12,5	12,5	Ethanol

2.3.4. Puffer und Lösungen

2.3.4.1. Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA

Tabelle 2-14: Lösungen zur Isolierung von Plasmid-DNA.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
Lösung I (Resuspensionspuffer)	Tris-Base	50 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen, RNase A (Tabelle 2-23) vor Gebrauch frisch zusetzen
	Na_4EDTA	10 mM	
	RNase A	100 µg/ml	
Lösung II (Lysepuffer)	NaOH	0,2 M	nicht autoklavieren
	SDS	1% (w/v)	
Lösung III (Neutralisierungspuffer)	Kaliumacetat	3 M	pH 5,2 mit Eisessig einstellen, Lagerung bei 4 °C

2.3.4.2. Lösungen zur Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten

Tabelle 2-15: Verwendete Lösungen zur Isolierung von pilzlicher gDNA.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Volumen	Bemerkungen
Extraktionspuffer	Tris-Base NaCl Na_4EDTA SDS β-Mercaptoethanol	100 mM 250 mM 25 mM 0,5% (w/v) 1% (v/v)	pH 8,0 mit HCl einstellen, β-Mercaptoethanol frisch vor Gebrauch zusetzen
Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)	Chloroform Isoamylalkohol	24 ml 1 ml	
TES-Puffer	Tris-Base Na_4EDTA SDS Proteinase K β-Mercaptoethanol	100 mM 10 mM 2% (v/v) 0,2 mg/ml 1,5% (v/v)	pH 8,0 mit HCl einstellen, Proteinase K und β-Mercaptoethanol vor Gebrauch frisch zusetzen

2.3.4.3. Lösungen zur Gelelektrophorese

Tabelle 2-16: Lösungen zur Agarose-Gelelektrophorese.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
50x TAE	Tris-Base Essigsäure 96% Na_4EDTA (pH 8,0)	2 M 400 mM 50 mM	
6x Probenpuffer	Glycerol Bromphenolblau	30% (v/v) 0,25% (w/v)	

Tabelle 2-17: Lösungen zur SDS-PAGE.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
Laufpuffer	Tris-Base Glycin SDS	25 mM 192 mM 0,1% (w/v)	
Trenngel (12%)	Tris•HCl (pH 8,8) Rotiphorese® Gel 30 SDS APS TEMED Wasser	375 mM 12% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) ad 10 ml	APS als letzten Bestandteil unmittelbar vor dem Gießen zugeben
Sammelgel (4%)	Tris•HCl (pH 6,8) Rotiphorese® Gel 30 SDS APS TEMED Wasser	125 mM 4% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) 0,1% (w/v) ad 10 ml	APS als letzten Bestandteil unmittelbar vor dem Gießen zugeben
5x Probenpuffer	Tris•HCl (pH 6,8) DTT SDS Bromphenolblau Glycerol	250 mM 500 mM 10% (w/v) 0,05% (w/v) 50% (v/v)	Lagerung bei -20 °C

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
Färbelösung	Coomassie Brilliant Blau G-250 Methanol Essigsäure Wasser	0,25% (w/v) 45% (w/v) 10% (w/v) 45% (w/v)	Lagerung vor Licht geschützt
Entfärbelösung	Methanol Essigsäure Wasser	45% (w/v) 10% (w/v) 45% (w/v)	

2.3.4.4. Lösungen zur Proteinreinigung

Tabelle 2-18: Puffer zur Reinigung von überproduzierten Proteinen aus *E. coli* mittels Nickel-Affinitätschromatographie und zur Gelfiltration. Alle Puffer zur Proteinreinigung wurden bei 4 °C gelagert.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
Lysepuffer	NaH_2PO_4 NaCl Imidazol Lysozym	50 mM 300 mM 10 mM 1mg/ml	pH 8,0 mit NaOH einstellen, Lysozym vor Gebrauch frisch zugeben
Waschpuffer	NaH_2PO_4 NaCl Imidazol	50 mM 300 mM 20 mM	pH 8,0 mit NaOH einstellen
Elutionspuffer	NaH_2PO_4 NaCl Imidazol	50 mM 300 mM 250 mM	pH 8,0 mit NaOH einstellen
Aufbewahrungspuffer	Tris-Base Glycerol	50 mM 15% (v/v)	pH 7,5 mit HCl einstellen

Tabelle 2-19: Puffer zur Reinigung von überproduzierten Proteinen aus *E. coli* mittels Glutathion-Sepharose-Affinitätschromatographie.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
10× PBS	NaCl KCl Na_2HPO_4 KH_2PO_4	1,4 M 27 mM 100 mM 18 mM	pH 7,3 einstellen
Elutionspuffer	Tris-Base reduziertes Glutathion	50 mM 10 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen

Tabelle 2-20: Puffer zur Reinigung von überproduzierten Proteinen aus *E. coli* unter denaturierenden Bedingungen und zur Renaturierung.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
10× IB Waschpuffer	Tris-Base Na_4EDTA Triton X-100	200 mM 100 mM 10% (v/v)	pH 7,5 mit HCl einstellen
10× IB Solubilisierungspuffer	CAPS	500 mM	pH 11,0 mit NaOH einstellen
30% N-Laurylsarkosin	N-Laurylsarkosin	30% (w/v)	
Lysepuffer	Tris-Base Na_4EDTA Saccharose	50 mM 1 mM 25% (w/v)	pH 8,0 mit HCl einstellen

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration	Bemerkungen
Inclusion Body Puffer 1 (IB1)	Tris-Base NaCl Na-desoxycholat EGTA	20 mM 0,2 M 1% (w/v) 2 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen
Inclusion Body Puffer 2 (IB2)	Tris-Base Na-desoxycholat EGTA	10 mM 0,25% (w/v) 1 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen
Solubilisierungspuffer	Harnstoff NaN_3 EGTA Tris-Base	8 M 0,1 mM 1 mM 10 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen
50× Dialysepuffer	Tris-Base	1 M	pH 8,5 mit HCl einstellen

Tabelle 2-21: Besondere Puffer zur Reinigung von überproduzierten Proteinen aus *S. cerevisiae*.

Bezeichnung	Bestandteil	Konzentration	Bemerkungen
Yeast Breaking Buffer	Tris-Base Glycerol DTT PMSF	50 mM 15% (v/v) 1 mM 1 mM	pH 7,5 mit HCl einstellen, PMSF vor Gebrauch frisch zugeben

2.3.4.5. Puffer, Lösungen und Medien für die Protoplastierung und Transformation von *A. niger* AB1.13

Tabelle 2-22: Lösungen zur Protoplastierung und Transformation von *A. niger* AB 1.13.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Volumen/ Menge	Bemerkungen
20× Nitratsalze	$NaNO_3$ KCl $MgSO_4$ 7 • H2O KH_2PO_4 Wasser	120 g 10,4 g 10,4 g 30,4 g ad 1000 ml	
Spurenelemente	$ZnSO_4$ • 7 H_20 H_3BO_4 $MnCl_2$ • 4 H_2O $FeSO_4$ • 7 H_2O $CoCl_2$ • 6 H_2O $CuSO_4$ • 5 H_2O $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ • 4 H_2O Na_4EDTA Wasser	2,2 g 1,1 g 0,5 g 0,5 g 0,16 g 0,16 g 0,11 g 5 g ad 100 ml	pH 6,5 mit KOH einstellen, nicht autoklavieren, nach erfolgtem Farbumschlag nach Violett steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C
GMM (Glucose-minimalmedium)	20× Nitratsalze Glucose Wasser	50 ml 10 g ad 1000 ml	pH 6,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, 1 ml Spurenelemente steril zugeben, für Δ*pyrG*-Stämme zusätzlich 2,4 g/l Uridin, zur Selektion von Δ*pyrG*-Stämmen zusätzlich 0,5 g/l 5-FOA
Osmotisches Medium, Lösung A	NaH_2PO_4	0,2 M	
Osmotisches Medium, Lösung B	Na_2HPO_4	0,2 M	

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Volumen/ Menge	Bemerkungen
Osmotisches Medium, Lösung C	Lösung A Lösung B	7 ml 93 ml	
Osmotisches Medium, Lösung E	$MgCl_2$ Lösung C	1,2 M 5 ml	pH 5,80 mit HCl oder Na_2HPO_4 einstellen, steril filtrieren, Lagerung bei 4 °C
Trapping Buffer	Sorbitol Tris-Base	600 mM 100 mM	pH 7,0 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4 °C
STC-Puffer	Sorbitol $CaCl_2$ Tris-Base	1,2 M 10 mM 10 mM	pH 7,5 mit HCl einstellen, Lagerung bei 4 °C
Calcium-PEG-Lösung	1 M $CaCl_2$ 60% (w/v) PEG 3350	150 µl 2,85 ml	Stocklösungen autoklavieren, vor Gebrauch steril mischen
Bottom-Medium	20× Nitratsalze Glucose Sorbitol Wasser	50 ml 10 g 219 g ad 1000 ml	pH 6,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, 1 ml Spurenelemente steril zugeben, für Δ*pyrG*-Stämme zusätzlich 2,4 g/l Uridin
Top-Agar	20× Nitratsalze Glucose Sorbitol Agar Wasser	10 ml 2 g 44 g 1,5 g ad 200 ml	pH 6,5 mit NaOH einstellen, autoklavieren, 0,2 ml Spurenelemente steril zugeben, für Δ*pyrG*-Stämme zusätzlich 2,4 g/l Uridin, vor Gebrauch auf ca. 45 °C temperieren

2.3.4.6. Sonstige Puffer und Lösungen

Tabelle 2-23: Sonstige Puffer und Lösungen.

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Volumen/ Menge	Bemerkungen
5× Bradford-Lösung	Serva Blau R-250 Ethanol 85% Phosphorsäure Wasser	70 mg 50 ml 100 ml ad 200 ml	Lagerung im Dunkeln bei 4 °C
1× Bradford-Lösung	5× Bradford-Lösung Wasser	20 ml 80 ml	nach der Verdünnung filtriert, Lagerung im Dunkeln bei 4 °C
10× BSA	BSA	1 mg/ml	Lagerung bei -20 °C
1× BSA	10× BSA	1× BSA	in Aufbewahrungspuffer (Tabelle 2-18) lösen, Lagerung bei -20 °C
DNase I	DNase I (min. 3000 U/mg)	1 mg/ml	in DNase I Puffer lösen, Lagerung bei -20 °C
DNase I Puffer	Tris-Base $MgCl_2$ Glycerin	20 mM 1 mM 50% (w/v)	pH 7,5 mit HCl einstellen
FPLC-Puffer	Tris-Base NaCl	50 mM 150 mM	pH 8,0 mit HCl einstellen, entgasen, Lagerung bei 4 °C
Natriumacetat zur DNA-Fällung	Natriumacetat	3 M	pH 5,2 mit Eisessig einstellen
RNase A	RNase A (U)	10 mg/ml	nach dem Lösen 20 min auf 100 °C erhitzt

Bezeichnung	Bestandteile	Konzentration/Volumen/ Menge	Bemerkungen
10× Taq-Puffer	KCl Tris-Base Triton X-100 $MgCl_2$	500 mM 100 mM 1% (v/v) 15 mM	pH 8,8 mit HCl einstellen

2.4. Kultivierungsbedingungen

2.4.1. Kultivierungsbedingungen für Bakterien

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in der Regel in LB-Medium (Tabelle 2-11) im Schüttelinkubator bei 220 rpm oder auf LB-Agar im Brutschrank bei 37 °C (Sambrook & Russell 2001). Entsprechend ihrer Resistenz wurden die Zellen unter Zusatz des jeweiligen Antibiotikums kultiviert. Dabei erfolgte die jeweilige Antibiotikagabe stets bei Plasmid-vermittelten Resistenzen und bei genomvermittelten Resistenzen nur bei untransformierten Zellen. Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht (16-18 h). Hauptkulturen wurden mit 2% (v/v) der entsprechenden Übernachtkultur inokuliert.

Zur Konservierung von Bakterienstämmen wurden die entsprechenden Zellen über Nacht vermehrt und in Aliquots zu 1 ml in 20% (v/v) Glycerol bei -80 °C gelagert.

2.4.2. Kultivierungsbedingungen für Ascomyceten

2.4.2.1. Kultivierungsbedingungen für *A. terreus*

Die Kultivierung von *A. terreus* erfolgte auf HME-Agar oder –Flüssigmedium (Tabelle 2-12) bei 30 °C unter Lichtausschluss.

2.4.2.2. Kultivierungsbedingungen für *C. globosum*

Die Kultivierung von *C. globosum* erfolgte auf CDH-Agar oder –Flüssigmedium (Tabelle 2-12) bei 24 °C unter Lichtausschluss.

2.4.2.3. Kultivierungsbedingungen für *A. niger* AB 1.13 und Transformanden

Zur Herstellung einer Sporensuspension wurde *A. niger* AB 1.13 auf GMM-Agar mit Uridinzusatz (Tabelle 2-22) ca. fünf Tage bei 30 °C unter Lichtausschluss kultiviert, Transformanten auf GMM-Agar ohne Uridin. Zur Selektion von Δ*pyrG*-Stämmen wurden zusätzlich 0,5 g/l 5-FOA (5-Fluororotsäure) zugesetzt, da 5-FOA durch die Orotidin-5'-phosphatdecarboxylase pyrG zu 5-Fluoruracil (5-FU) umgesetzt wird, das zum Absterben der Zellen führt. Die Kultivierung zur Untersuchung der Sekundärstoffproduktion erfolgte jeweils im entsprechenden GMM- und PD-Flüssigmedium bei 30 °C und 140 rpm.

2.4.2.4 Kultivierungsbedingungen für *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* INVSc1 erfolgte nach Herstelleranweisung auf HPD-Agar (Tabelle 2-12) im Brutschrank bei 30 °C. Die Selektion transformierter Zellen wurde auf SC-U-Platten (Tabelle 2-12) bei 30 °C durchgeführt.

2.4.3 Herstellung einer Sporensuspension von Ascomyceten

Auf eine gut sporulierende Platte wurden 3 ml Tween® 20-Lösung (0,1%, v/v) gegeben, die Sporen mithilfe einer sterilen Impföse abgeschabt und in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Zur erhaltenen Suspension wurden etwa 1 ml Glasperlen (Ø 2,85-3,45 mm, Roth, Karlsruhe) hinzugefügt und anschließend etwa 30 s gevortext. Zur Entfernung der Glasperlen und Mycelbruchstücke wurde die Suspension über Watte filtriert und anschließend zentrifugiert (3000× *g*, 5 min, 4 °C). Der Überstand wurde entfernt und die Sporen in 500 µl Glycerinlösung (20% v/v) resuspendiert und in Aliquots zu 100 µl bei -80 °C gelagert.

2.5 Methoden der Molekularbiologie

2.5.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde mittels Alkalischer Lyse (Birnboim & Doly 1979) im Mini- und Maximaßstab durchgeführt. Dazu fand prinzipiell der Stamm XL1-Blue MRF‘ Anwendung. Positive Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher gepickt und in LB-Medium überführt.

Zur Minipräparation wurden plasmidtragende *E. coli*-Kolonien in 5 ml LB-Medium (Tabelle 2-11) unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C und 220 rpm über Nacht kultiviert. Zweimal 2 ml Bakterienkultur wurden in einem 2 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert (17000× *g*, 5 min, 4 °C), das Medium entfernt und die Zellen in 250 µl Lösung I (Tabelle 2-14) resuspendiert. Nach Zusatz von 250 µl Lösung II und leichtem Mischen durch Invertieren wurde so lange bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Lyse der Zellen durch eine Klärung der Lösung zu erkennen war (ca. 5 min). Die Neutralisierung durch Zusatz von 250 µl kalter Lösung III führte zur Fällung von chromosomaler DNA und Proteinen, die nach 10 min Inkubation auf Eis durch Zentrifugation (17000x *g*, 20 min, 4 °C) zusammen mit den Zelltrümmern pelletiert werden konnten. Der klare Überstand wurde in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 750 µl Isopropanol versetzt. Dadurch wurde die Plasmid-DNA gefällt und konnte durch Zentrifugation (17000x *g*, 20 min, 4 °C) pelletiert werden. Das Plasmid-DNA-Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert und

anschließend getrocknet. Die Rücklösung fand in 50 µl $Wasser_{bidest.}$ bei 4 °C über Nacht statt, die Lagerung erfolgte anschließend bei -20 °C.

Zur Maxipräparation wurden plasmidtragende *E. coli*-Kolonien in 100 ml LB-Medium unter Zusatz des entsprechenden Antibiotikums bei 37 °C und 220 rpm über Nacht kultiviert. Die Bakterienkultur wurde zweimal in einem 50 ml-Reaktionsgefäß zentrifugiert (6000× *g*, 10 min, 4 °C), das Medium entfernt und die Zellen in 4 ml Lösung I mit 100 µl RNase A-Lösung (Tabelle 2-23) resuspendiert. Nach Zusatz von 8 ml Lösung II und leichtem Mischen durch Invertieren wurde so lange inkubiert, bis die Lyse der Zellen durch eine Klärung der Lösung zu erkennen war (ca. 10 min). Die Neutralisierung erfolgte durch Zusatz von 6 ml kalter Lösung III und nach 30 min Inkubation auf Eis und Zusatz von 1 ml Chloroform zur besseren Sedimentation von Kalium-SDS wurden die Zelltrümmer, Proteine und gDNA durch Zentrifugation (6000× *g*, 30 min, 4 °C) entfernt. Der klare Überstand wurde in ein frisches 50 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Die Plasmid-DNA wurde durch Zentrifugation (17000× *g*, 30 min, 4 °C) pelletiert und anschließend mit 10 ml Ethanol (70% v/v) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation und Trocknung fand die Rücklösung fand in 1 ml $Wasser_{bidest.}$ bei 4 °C über Nacht statt, die Lagerung erfolgte anschließend bei -20 °C.

2.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus Ascomyceten

100 ml flüssiges Nährmedium (Tabelle 2-12) wurden in einem 300 ml-Erlenmeyerkolben mit Sporen inokuliert und ca. fünf Tage im Dunkeln stationär inkubiert. Das auf der Oberfläche gewachsene Mycel wurde mit einem sterilen Spatel in einen vorgekühlten Mörser überführt und mit flüssigem Stickstoff pulverisiert. Ca. 100 mg Pulver wurden in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 700 µl Extraktionspuffer (Tabelle 2-15) versetzt und durch Vortexen gemischt. Der Ansatz wurde mindestens für 30 min bei 65 °C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Nach Zusatz von einem Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (Tabelle 2-15) wurde gemischt und zentrifugiert (17000× *g*, 10 min, Raumtemperatur). Der Überstand wurde in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 25 µl RNase A-Lösung (Tabelle 2-23) versetzt. Nach Inkubation für 10 min bei 37 °C wurde erneut ein Vol. Chloroform/Isoamylalkohol zugegen, gemischt und zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit einem Vol. Isopropanol vermischt und 30 min inkubiert. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation (1000× *g*, 5 min, Raumtemperatur) pelletiert, mit 500 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in 200 µl $Wasser_{bidest.}$ über Nacht bei 4 °C zurückgelöst. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.5.3 Isolierung von genomischer DNA aus *A. niger* AB 1.13 und Transformanten

A. niger AB 1.13 und mögliche Transformanten wurden in 100 ml PD-Medium (Tabelle 2-12) mit bzw. ohne Uridinzusatz bei 30 °C und 140 rpm für 6 Tage kultiviert. Das Mycel wurde vollständig von Medienrückständen befreit und im Mörser unter Stickstoff-zugabe pulverisiert. Ca. 100 mg Mycel wurden mit 850 µl TES-Puffer versetzt, kräftig gemischt und bei 50 °C für mindestens 30 min und anschließend für 30 min bei 65 °C inkubiert. Nach Zugabe von einem Vol. Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Tabelle 2-15) wurde durch Invertieren gemischt und 10 min bei 17000× *g* und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Wasserphase wurde erneut mit einem Vol. Roti®-Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol gewaschen und zentrifugiert und anschließend mit einem Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (Tabelle 2-15) gewaschen Nach der Zentrifugation wurde mit 0,04 Vol. 5 M NaCl und 0,8 Vol. Isopropanol versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Pelletierung erfolgte anschließend durch Zentrifugation für 5 min bei 3000× *g* und Raumtemperatur. Nach einem Waschschritt mit 500 µl 70% (v/v) Ethanol wurde für 10 min bei 50 °C getrocknet und die DNA schließlich über Nacht in 200 µl $Wasser_{bidest.}$ zurückgelöst.

2.5.4 Isolierung von RNA aus *C. globosum*

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde das *E.Z.N.A.™ Fungal RNA Miniprep Kit* (Tabelle 2-4) nach Herstelleranleitung eingesetzt.

Fünf Tage altes Mycel von einer nicht geschüttelten CDH-Flüssigkultur (Tabelle 2-12) von *C. globosum* DSM 1962 wurde in einem Mörser mithilfe von flüssigem Stickstoff pulverisiert. Ca. 100 mg Pulver wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und sofort mit 500 µl Lösung RB versetzt, die bereits 2% (v/v) β-Mercaptoethanol enthielt. Nach gründlichem Vortexen wurde das Lysat auf eine Säule (*homogenization spin column*, grün) pipettiert und für 5 min bei 17000× *g* und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand des Durchflusses wurde in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt, mit 0,5 Vol. Ethanol gemischt und auf eine Säule (HiBind® *RNA spin column*, rot) pipettiert. Nach Zentrifugation für 30 s bei 10000× *g* und Raumtemperatur wurden der Durchfluss verworfen und 75 µl *DNase I digestion reaction mix* (73,5 µl OBI *DNase I digestion buffer*, 1,5 µl *RNase-free DNase I*, 20 Kunitz units/µl) direkt auf die Säulenmembran aufgetragen. Der DNase-Verdau wurde für 15 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurden 500 µl *RNA wash buffer I* aufgetragen. Nach 5 min wurde für 30 s bei 10000× *g* und Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Ein zweiter Waschschritt erfolgte mit 500 µl *RNA Wash Buffer II*. Erneut wurde für 30 s bei 10000× *g* und Raumtemperatur zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Im Anschluss wurde die Säule zum Trocknen der Membran für

1 min bei 17000× *g* und Raumtemperatur zentrifugiert. Die Säule wurde auf ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt. Nach Auftragen von 50 µl DEPC-versetztem Wasser und Inkubation für 10 min wurde für 1 min bei 17000× *g* und Raumtemperatur zentrifugiert. Die erhaltene RNA wurde direkt in einer RT-Reaktion (2.5.10.3) verwendet.

2.5.5 Reinigung und Konzentrierung von DNA

2.5.5.1 Alkohol-Fällung

Die Fällung von DNA mit Alkoholen führt zur Reinigung von DNA-Lösungen, da Salze und andere niedermolekulare, wasserlösliche Substanzen in Lösung bleiben. Die gefällte DNA kann anschließend in einem beliebigen Volumen zurückgelöst werden, sodass auch eine Konzentrierung durchgeführt werden kann. Es können verschiedene Alkohole eingesetzt werden, bei der Durchführung der vorliegenden Arbeiten wurde Ethanol verwendet.

Die DNA-Lösung wurde mit 0,1 Vol. 3 M Natriumacetatlösung (Tabelle 2-23) und 2,5 Vol. Ethanol (Endkonzentration ca. 70% v/v) vermischt. Der Ansatz wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, bei DNA-Konzentrationen unter 250 ng/µl mindestens 30 min bei -20 °C. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (17000× *g*, 15 min, 4 °C) pelletiert und mit 500 µl Ethanol (70% v/v) gewaschen, erneut zentrifugiert und nach der Trocknung in $Wasser_{bidest.}$ zurückgelöst.

2.5.5.2 Konzentrierung mittels Vakuumzentrifuge

Salzarme DNA-Lösungen wurden in der Vakuumzentrifuge eingeengt, aber nie vollständig getrocknet.

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Nukleinsäuren erfolgte nach ihrer Größe mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese. Fragmente zwischen 1000 und 3000 bp wurden standardmäßig in 0,8% (w/v) Agarose getrennt, Fragmente zwischen 100 und 1000 bp in 2%igen Gelen und Fragmente über 3000 bp in 0,5%igen Gelen. Die Agarose wurde in 1× TAE-Puffer (Tabelle 2-16) durch Erhitzen in der Mikrowelle gelöst, mit 1× *SYBR® Safe* (Tabelle 2-1) versetzt, in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen und mit einem Probenkamm versehen. Nach Erstarren der Agarose wurde der Gelschlitten in die mit 1× TAE-Puffer beladene Elektrophorese-kammer gelegt und der Probenkamm entfernt. 10 µl einer DNA-Lösung wurden mit 2 µl 6× Probenpuffer (Tabelle 2-16) gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Als Größen- und Konzentrationsstandard wurde der Größenmarker *GeneRuler™ DNA Ladder*

Mix (Tabelle 2-4) verwendet. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte bei ca. 5 V/cm Elektrodenabstand. Zur Detektion und Dokumentation wurde das Gel nach abgeschlossener Elektrophorese mithilfe des ImageQuant 100 (Tabelle 2-2) unter UV-Licht der Wellenlänge λ=312 nm fotographiert.

2.5.6.1 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur Isolierung einzelner DNA-Fragmente wurden diese mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, unter UV-Licht der Wellenlänge λ=365 nm identifiziert und mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente wurde nach Herstelleranweisungen mit dem *HiYield PCR Clean-up and Gel-Extraction Kit* (Tabelle 2-4) durchgeführt. Zur Elution wurde autoklaviertes $\text{Wasser}_{\text{bidest.}}$ benutzt, das auf 72 °C erhitzt worden war.

2.5.7 Konzentrationsbestimmung von DNA-Lösungen

2.5.7.1 Konzentrationsbestimmung nach Agarose-Gelelektrophorese

Nach erfolgter Agarose-Gelelektrophorese (2.5.6) wurde die Konzentration der DNA-Fragmente durch Vergleich der Bandenintensität des DNA-Größenstandards mit bekannter Konzentration abgeschätzt.

2.5.7.2 Konzentrationsbestimmung mittels UV-Absorption

Die Konzentration von gereinigten DNA-Lösungen wurde mittels UV-Absorption bestimmt. Dabei entspricht eine OD_{260} von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml dsDNA. Es wurde im *NanoDrop* (Tabelle 2-2) dreimal jeweils 1 µl DNA-Lösung gegen $\text{Wasser}_{\text{bidest.}}$ als Nullwert vermessen und aus den erhaltenen Werten der Mittelwert bestimmt. Den Messungen wurde folgende Formel zu Grunde gelegt:

Formel 2-1: Bestimmung der Konzentration von Nucleinsäurelösungen. C = Konzentration der Ausgangslösung, A = Absorption bei 260 nm, F = Multiplikationsfaktor (50 für dsDNA), V = Verdünnungsfaktor.

$$c\left[\frac{\mu g}{ml}\right] = A \times V \times F\left[\frac{\mu g}{ml}\right]$$

Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm, das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} zeigt daher an, wie stark eine DNA-Lösung durch Alkohole und Proteine verunreinigt ist. Ein Verhältnis von 1,8 spricht für eine saubere DNA-Isolierung. Das Verhältnis OD_{230}/OD_{260}, das idealerweise bei 0,45 liegen sollte, ist ein Indikator für weitere Verunreinigungen, z.B. mit Polysacchariden.

2.5.8 DNA-Manipulation

2.5.8.1 Restriktion durch Endonukleasen

Zu analytischen Zwecken wurden Restriktionen in 10 µl-Maßstab durchgeführt. Die zu untersuchenden DNA-Lösungen wurden mit Restriktionsenzym (Tabelle 2-4) und dem entsprechenden Reaktionspuffer gemischt und mit autoklaviertem $Wasser_{bidest.}$ auf ein Endvolumen von 10 µl verdünnt. Die Reaktionen wurden nach Anweisungen der jeweiligen Hersteller durchgeführt.

Restriktionen im präparativen Maßstab zur anschließenden Isolierung von DNA-Fragmenten wurden in einem Endvolumen von bis zu 100 µl durchgeführt.

2.5.8.2 Dephosphorylierung

Um die Effizienz von anschließenden Ligationen bei Vorliegen von kompatiblen Enden zu verbessern, wurde der jeweilige Vektor mittels Shrimp-Alkaline-Phosphatase (SAP, Tabelle 2-4) dephosphoryliert. Dazu wurde die SAP mit dem Vektor nach Hersteller-anweisungen für 1 h bei 37 °C inkubiert und anschließend für 20 min bei 65 °C deaktiviert.

2.5.8.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsreaktionen wurden in einem Endvolumen von 10-20 µl bei 4 °C über Nacht durchgeführt. Für Ligationen von PCR-Produkten in den Klonierungsvektor pGEM®-T easy wurden die gelieferten Kitkomponenten nach Hersteller-anweisungen eingesetzt. Ligationen von Inserts in Expressionsvektoren wurden mit der T4-DNA-Ligase (Jena Bioscience, Tabelle 2-4) und dem mitgelieferten Reaktionspuffer durchgeführt. Die Zusammensetzungen der Ligationsansätze sind in Tabelle 2-24 wieder-gegeben.

Tabelle 2-24: Schemata der Ligationsansätze für pGEM® T easy bzw. andere Vektoren.

pGEM®-T easy		Andere Vektoren	
Komponente	**Volumen**	**Komponente**	**Volumen**
PCR-Produkt	variabel	Insert	variabel
pGEM®-T easy (50 ng/µl)	50 ng/10 µl	Vektor	variabel
T4-DNA Ligase (3 *Weiss units*/µl)	3 *Weiss units*/10 µl	T4-DNA Ligase (2,5 *Weiss units*/µl)	2,5 *Weiss units*/10 µl
2× *Rapid Ligation Buffer*	1×	10× T4-Ligase Puffer	1×

In der Regel wurde ein molares Verhältnis von Insert und linearisiertem Vektor von 5:1 eingesetzt. Die Menge an benötigtem Insert wurde nach der folgenden Formel berechnet:

Formel 2-2: Berechnung der benötigten Insertmenge für die Ligation mit einem molaren Verhältnis von Fragment zu Vektor von 5:1. Nach Herstelleranweisung von pGEM® T easy.

$$\text{Masse(Insert) [ng]} = \frac{5}{1} \times \frac{\text{Masse (Vektor) [ng]} \times \text{Länge (Fragment) [bp]}}{\text{Länge (Vektor) [bp]}}$$

Nach erfolgter Ligationsreaktion wurde die T4-DNA-Ligase für 20 min bei 65 °C deaktiviert. Etwa 5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF‘ eingesetzt.

2.5.9 DNA-Transformation

2.5.9.1 Transformation von *E. coli*

2.5.9.1.1 Herstellung Ca^{2+}-kompetenter Zellen

Ca^{2+}-kompetente Zellen wurden ausgehend von Glycerolkulturen (2.4.1) hergestellt. Bei einer bestehenden Antibiotikaresistenz wurde das jeweilige Antibiotikum den Medien zugesetzt.

Zellen aus einer Glycerolkultur wurden auf einer LB-Agarplatte (Tabelle 2-11) ausgestrichen und über Nacht kultiviert. Eine einzelne Kolonie wurde zur Herstellung einer Vorkultur in 3 ml LB-Medium überführt, welche wiederum am nächsten Tag zur Inokulation von 100 ml frischem LB-Medium genutzt wurde. Die Zellen wurden bei 37 °C und 180 rpm kultiviert, bis sie eine OD_{600} von 0,6 erreichten. Nach Kühlung auf Eis für 15 min wurden die Zellen durch Zentrifugation (3000× *g*, 10 min) pelletiert und anschließend in 30 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation und Resuspendierung in 20 ml 0,1 M $CaCl_2$-Lösung wurden die Zellen 20 min auf Eis inkubiert. Die Pelletierung der Zellen erfolgte wieder durch Zentrifugation, die erhaltenen Zellen wurden dann vorsichtig in 5 ml eiskalter 0,1 M $CaCl_2$-Lösung mit 15% (v/v) Glycerol resuspendiert und in Aliquots zu 200 µl bei -80 °C gelagert.

2.5.9.1.2 Transformation Ca^{2+}-kompetenter Zellen

Zur Transformation wurden kompetente Zellen (2.5.9.1.1) für 15 min auf Eis aufgetaut. Währenddessen wurde die zu transformierende DNA in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vorgelegt und auf Eis vorgekühlt. Bei Verwendung von Plasmid-DNA wurde ca. 1 ng DNA verwendet, wobei ein Volumen von 10 µl nicht überschritten wurde. Die aufgetauten Zellen wurden zur DNA gegeben, vorsichtig durchmischt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 2 min bei 42 °C wurden die Zellen für 2 min auf Eis heruntergekühlt und mit 500 µl SOC-Medium (Tabelle 2-11) ohne Antibiotikazusatz versetzt. Die Regeneration erfolgte bei 37 °C und 180 rpm für mindestens eine Stunde. Anschließend

wurden jeweils 350 µl auf einer LB-Agarplatte mit Zusatz des entsprechenden Antibiotikums ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

2.5.9.1.3 Blau-Weiß-Selektion

Die Unterscheidung anhand der Farbe der nach Transformation (2.5.9.1.2) von pGEM®-T easy-Ligationsansätzen erhaltenen Kolonien diente zur Vorselektion möglicher positiver Klone.

Die zur Blau-Weiß-Selektion genutzten *E. coli* XL1-Blue MRF‘ tragen eine Deletion im *lacZ*-Gen, was die Produktion einer funktionellen β-Galactosidase unterbindet. Durch eine α-Komplementation mit dem Klonierungsvektor pGEM®-T easy, der die kodierende Sequenz für die α-Region der β-Galactosidase enthält, kann der Stamm ein funktionelles Enzym produzieren, wenn IPTG als künstlicher Induktor des *lac*-Operons hinzugefügt wird. Innerhalb des *lacZ*-Genes befinden sich die zur A-Klonierung verwendeten T-Überhänge und die multiple Klonierungsstelle (MCS). Nach einer erfolgreichen A-Klonierung eines Fragmentes ist das *lacZ*-Gen unterbrochen und eine Komplementation nicht mehr möglich. Zur Selektion wurden nun *E. coli* XL1-Blue MRF‘ nach der Regenerationsphase auf LB-Platten zur Blau-Weiß-Selektion (Tabelle 2-11) ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Das enthaltene IPTG induziert die Überproduktion der β-Galactosidase, wenn kein Fragment in den Vektor ligiert wurde. Das ebenfalls zugesetzte, farblose X-Gal wird durch die β-Galactosidase zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-3-hydroxyindol hydrolysiert, welches wiederum durch Luftsauerstoff zum blauen 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlorindigo oxidiert wird. Kolonien von Zellen, die solche Plasmide tragen, erscheinen blau, während Kolonien von Zellen, die rekombinante Plasmide enthalten, farblos verbleiben. Eine Verstärkung der Blaufärbung zu leichteren Unterscheidung wurde durch eine Lagerung bei 4 °C für bis zu zwei Stunden erreicht.

2.5.9.2 Transformation von *S. cerevisiae* INVSc1

Die Herstellung von kompetenten Zellen und deren Transformation wurden nach Herstellerangaben mit dem *S. c.* EasyComp™ Transformation Kit (Tabelle 2-4) durchgeführt.

2.5.9.2.1 Herstellung kompetenter Zellen

Zellen von *S. cerevisiae* INVSc1 wurden auf einer HPD-Platte (Tabelle 2-12) ausgestrichen und bei 28 °C für 2 Tage inkubiert. Eine einzelne Kolonie wurde zur Inokulation von 10 ml HPD-Medium verwendet und die Kultur über Nacht bei 28 °C und 280 rpm inkubiert. Es wurden so viele Zellen abgenommen, dass sich in 10 ml frischem HPD-Medium eine OD_{600} von 0,2 bis 0,4 ergab. Die Kultur wurde bei 28 °C und 280 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 bis 1,0 weiter inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin durch

Zentrifugation (500× *g*, 5 min, Raumtemperatur) geerntet und in 10 ml *Solution I* aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml *Solution II* aufgenommen, zu 50 µl aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.5.9.2.2 Transformation kompetenter Zellen

50 µl kompetente Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. 1-5 µg Vektor-DNA mit einem Volumen von maximal 5 µl wurden hinzugegeben und die Mischung mit 500 µl Transformationslösung (*Solution III*) versetzt. Nach starkem Mischen wurde der Ansatz für eine Stunde bei 30 °C inkubiert und alle 15 min stark gemischt. Je 100 µl des Transformationsansatzes wurden auf eine SC-U-Agarplatte (Tabelle 2-12) ausgestrichen und für zwei bis vier Tage bei 30 °C inkubiert.

2.5.9.3 Protoplastierung und Transformation von *A. niger* AB1.13

Die hierfür verwendeten Lösungen und Medien sind in Tabelle 2-22 aufgelistet. Alle Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Von ca. 4 gut sporulierenden Platten (GMM mit Uridinzusatz) wurden Sporen mithilfe von Tween® 20-Lösung (0,1%, w/v) gesammelt und wie beschrieben (2.4.3) zentrifugiert. Nach Filtration über Watte wurden die Sporen mit 20 ml sterilem $Wasser_{bidest.}$ gewaschen und erneut zentrifugiert. Mit den erhaltenen Sporen wurden 400 ml GMM mit Uridinzusatz angeimpft und im einem 2000 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikane und mit Aluminiumfolie verschlossen bei 30 °C und 130 rpm über Nacht kultiviert. Nach ca. 12 h wurde durch mikroskopische Kontrolle überprüft, ob eine ausreichende Keimung stattgefunden hat. Dabei sollten die Keimschläuche etwa zwei- bis dreimal so lang wie der Konidiendurchmesser sein. Das gekeimte Material wurde in 50 ml-Reaktionsgefäßen abzentrifugiert (3000× *g*, 5 min, 4 °C), gewogen und in 50 ml Osmotischem Medium Lösung E im 500 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikane resuspendiert. Die Protoplastierung erfolgte durch Zugabe von *lysing enzyme* aus *Trichoderma harzianum* (50 mg je g Konidienfeuchtgewicht) bei 30 °C und 80 rpm. Nach ca. 4 h waren nach mikroskopischer Kontrolle ausreichend Protoplasten zu erkennen. Die Protoplastensuspension wurde in zwei 50 ml-Reaktionsgefäße überführt und vorsichtig mit jeweils 7 ml *trapping buffer* überschichtet. Nach Zentrifugation (3000× *g*, 15 min, 4 °C) waren die Protoplasten als trübe Schicht zwischen Osmotischem Medium und *trapping buffer* zu erkennen und wurden zur Minimierung der Scherkräfte mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze in ein frisches 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Protoplasten wurden mit etwa 2 Vol. STC-Puffer versetzt und zentrifugiert (3000× *g*, 15 min, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml STC-Puffer vorsichtig resuspendiert und in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß erneut zentrifugiert (17000× *g*, 20 s, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen und die

Protoplasten in 220 µl STC-Puffer resuspendiert. Zweimal 10 µl Suspension wurden zur Bestimmung des Protoplastentiters abgenommen (s.u.).

Zur Transformation wurden ca. 10 µl des gewünschten Transformationskonstruktes mit STC-Puffer auf 100 µl aufgefüllt und mit 100 µl Protoplastensuspension gemischt. Nach 50 min Inkubation auf Eis wurde der Transformationsansatz zu 1,25 ml Calcium-PEG-Lösung in ein 15 ml-Reaktionsgefäß pipettiert, durch sanftes Rollen gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde mit STC-Puffer auf 6 ml aufgefüllt. Jeweils 600 µl wurden auf eine Platte Bottom-Medium ohne Uridin pipettiert, sofort mit etwa 5 ml Top-Agar ohne Uridin übergossen und zum Verteilen der Transformanden vorsichtig geschwenkt. Die Inkubation erfolgte im Dunklen bei 30 °C.

Nach jeweils drei bis vier Tagen wurden sichtbare Transformantenkolonien zur weiteren Selektion zweimal auf GMM-Platten umgesetzt, wobei möglichst nur Sporen ausplattiert wurden.

Zur Bestimmung des Protoplastentiters wurden in einer Verdünnungsreihe (1×10^{-1} bis 1×10^{-8}) jeweils 10 µl Protoplastensuspension mit 90 µl STC-Puffer verdünnt und wie beschrieben auf Bottom-Medium mit Uridinzusatz pipettiert und mit etwa 5 ml Top-Agar mit Uridinzusatz übergossen. Zur Bestimmung von nicht protoplastierten Zellen wurden 10 µl Protoplastensuspension statt in STC-Puffer in $Wasser_{bidest.}$ verdünnt, wodurch Protoplasten zum Platzen gebracht wurden. Nach zwei bis drei Tagen Inkubation wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und der Protoplastentiter aus der Differenz der in STC-Puffer und in Wasser verdünnten Zellen bestimmt.

2.5.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle PCR-Ansätze wurden in einem Endvolumen von 50 µl angesetzt und mit autoklaviertem $Wasser_{bidest.}$ aufgefüllt. Eine Gradienten-PCR diente zur Bestimmung der optimalen Anlagerungstemperatur für Primerpaare.

Tabelle 2-25: Bedingungen für Gradienten-PCR.

Bestandteil	Konzentration	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
template-DNA	5-500 ng gDNA	Initiale Denaturierung	94	5:00	1
		Denaturierung	94	0:30	30
Primer (10 pmol/µl)	je 0,4 µM	Anlagerung	variabel	1:00	
dNTP Mix (je 2,5 mM)	je 0,2 mM	Elongation	72	variabel	
10× Puffer	1×	Finale Elongation	72	7:00	1
Taq-Polymerase	2,5 U	Kühlung	4	∞	1

Die unterschiedlichen Anlagerungstemperaturen wurden in 8 parallelen Ansätzen getestet. Die Elongationsdauer richtete sich nach der Länge der zu amplifizierenden Sequenz (1:00 min/kb).

2.5.10.1 PCR zur Klonierung

Zur Amplifikation von Gensequenzen, die zur Klonierung verwendet wurden, wurde das Expand™ High Fidelity PCR System Kit (Tabelle 2-4) verwendet. Dieses Kit enthält ein Gemisch aus der Taq-DNA-Polymerase und einem hitzestabilen Protein ohne DNA-Polymerase-, jedoch mit Korrekturlese-Aktivität.

Tabelle 2-26: Bedingungen für Amplifikation von *tdiA*-Homologen.

Bestandteil	Konzentration	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
template-DNA	5-500 ng gDNA	Initiale Denaturierung	94	5:00	1
		Denaturierung	94	0:30	
Primer (10 pmol/µl)	je 0,4 µM	Anlagerung	variabel	1:00	30
dNTP (je 10 mM)	je 0,2 mM	Elongation	72	4:00	
10× Puffer	1×	Finale Elongation	72	7:00	1
High Fidelity Polymerase	2,5 U	Kühlung	4	∞	1
Die Anlagerungstemperatur für *CHGG_03687* betrug 59 °C, für Homologe aus *A. terreus* 50 °C.					

Bei Vorliegen von Intronsequenzen in der gDNA wurden die einzelnen Exon-Sequenzen getrennt amplifiziert, aufgereinigt und nacheinander in einer weiteren PCR miteinander fusioniert. Die gesamte kodierende Gensequenz wurde anschließend mit den beiden äußeren Primern (Primer 1 und 6, Abbildung 2-1) vervielfältigt und in den Klonierungsvektor pGEM®-T easy ligiert (Tabelle 2-4). Diese Methode wurde zur Herstellung der Klonierungskonstrukte pST14, pST22 und pST35 angewendet.

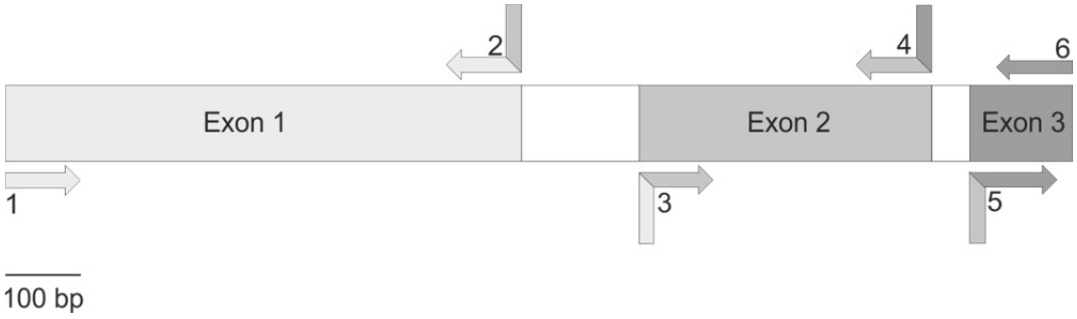


Abbildung 2-1: Schema der verwendeten Primer zur Amplifikation der Exons am Beispiel von *CHGG_03684*. Zahlen bezeichnen die verwendeten Primer. Primer, die im Inneren der Gensequenz binden, enthalten überlappende Sequenzen mit dem benachbarten Exon. Diese Sequenzen wurden genutzt, um die Exons in einer PCR miteinander zu fusionieren. Die Darstellung der Primer ist nicht maßstabsgerecht.

Tabelle 2-27: Bedingungen für Amplifikation von einzelnen Exons von *CHGG_03684* und zur Fusion.

Bestandteil	Konzentration	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
template-DNA	5-500 ng (gDNA) 1-10 ng (amplifizierte, gereinigte Exonsequenz)	Initiale Denaturierung	94	5:00	1
		Denaturierung	94	0:30	
Primer (10 pmol/µl)	je 0,4 µM	Anlagerung	60	1:00	30
dNTP Mix (je 10 mM)	je 0,2 mM	Elongation	72	1:30	
10× Puffer	1×	Finale Elongation	72	7:00	1
High Fidelity Polymerase	2,5 U	Kühlung	4	∞	1

Tabelle 2-28: Bedingungen für Amplifikation von einzelnen Exons von *ATEG_00702* und zur Fusion.

Bestandteil	Konzentration	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
template-DNA	5-500 ng (gDNA) 1-10 ng (amplifizierte, gereinigte Exonsequenz)	Initiale Denaturierung	94	5:00	1
		Denaturierung	94	0:30	
Primer (10 pmol/µl)	je 0,4 µM	Anlagerung	55	0:30	30
dNTP Mix (je 10 mM)	je 0,2 mM	Elongation	72	variabel	
10× Puffer	1×	Finale Elongation	72	7:00	1
High Fidelity Polymerase	2,5 U	Kühlung	4	∞	1
DMSO	5% (v/v)				
Die Elongationszeit für die Exons 1 und 2 betrug 1:00 min, für Exon 3 0:30 min, für die Fusion der Exons jeweils 1:00 min und für die Amplifikation der gesamten Sequenz 1:15 min.					

Tabelle 2-29: Bedingungen für Amplifikation von einzelnen Exons von *ATEG_09980* und zur Fusion.

Bestandteil	Konzentration	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
template-DNA	5-500 ng (gDNA) 1-10 ng (amplifizierte, gereinigte Exonsequenz)	Initiale Denaturierung	94	5:00	1
		Denaturierung	94	0:30	
Primer (10 pmol/µl)	je 0,4 µM	Anlagerung	62	1:00	30
dNTP Mix (je 10 mM)	je 0,2 mM	Elongation	72	1:30	
10× Puffer	1×	Finale Elongation	72	7:00	1
High Fidelity Polymerase	2,5 U	Kühlung	4	∞	1

2.5.10.2 PCR zur zielgerichteten Mutagenese

Den Experimenten zur Einführung von zielgerichteten Mutationen lagen zwei unterschiedliche Protokolle zum DpnI-Verdau (Shenoy & Visweswariah 2003) und zum Primerdesign (Zheng *et al.,* 2004) zugrunde. Zur Durchführung der PCR wurde das *Expand™ High Fidelity PCR System Kit* (Tabelle 2-4) verwendet.

Zum Austausch von Aminosäuren wurden je Mutation zwei Primer eingesetzt, die die jeweilige Mutation trugen. Jeder Primer hatte eine Länge von ca. 40 bp. Die Mutation befand sich dabei etwa 10 bp vom 5'-Ende entfernt, ungefähr in der Mitte des komplementären Bereiches der beiden Primer. Am 5'- als auch am 3'-Ende lag möglichst entweder eine Guanin- oder eine Cytosinbase. Die Schmelztemperatur wurde um 80 °C angesetzt und nach folgender Formel berechnet:

Formel 2-3:Berechnung der Schmelztemperatur von Primern. T_m: Schmelztemperatur. % GC: prozentualer Anteil an GC-Basen. N: Gesamtzahl der Basen. % Fehlpaarung: prozentualer Anteil der fehlgepaarten Basen.

$$\mathrm{T}_m = 81{,}5 + 0{,}41\ (\%\ \mathrm{GC}) - \frac{675}{\mathrm{N}} - (\%\ \mathrm{Fehlpaarung})$$

Als *template* diente ein *dam*-methyliertes Expressionskonstrukt, das zuvor aus *E. coli* XL1-Blue MRF' aufgereinigt wurde. Die Bedingungen der PCR sind in Tabelle 2-30 dargestellt. Nach durchgeführter PCR wurden 40 µl des Ansatzes mit 20 U DpnI versetzt und für 4 h bei 37 °C inkubiert. Dabei erfolgte der Verdau der unmutierten, methylierten Ursprungs-Plasmid-DNA. 1 µl des Verdaus wurde zur Transformation (2.5.9.1.2) von *E. coli* XL1-Blue MRF' eingesetzt.

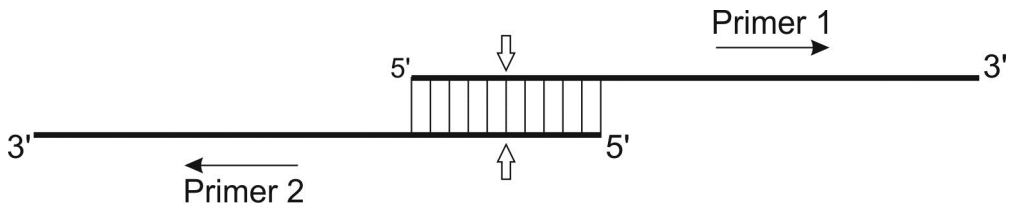


Abbildung 2-2: Schema eines Primerpaares zur Einführung von zielgerichteten Mutationen. Der schraffierte Bereich symbolisiert die komplementären Bereiche der Primer, Pfeile markieren die ungefähre Lage der Mutationen.

Tabelle 2-30: Bedingungen für die PCR zur zielgerichteten Mutagenese.

Bestandteil	Konzentration	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Plasmid-DNA	1-10 ng	Initiale Denaturierung	94	3:00	1
Primer (10 pmol/µl)	je 0,6 µM	Denaturierung	94	1:00	16
dNTP Mix (je 10 mM)	je 0,2 mM	Anlagerung	55	1:00	
10× Puffer	1×	Elongation	68	5:30	
High Fidelity Polymerase	2,5 U	Finale Elongation	68	7:00	1
		Kühlung	4	∞	1

2.5.10.3 Reverse Transkription von mRNA und Amplifikation von cDNA

Die in 2.5.4 erhaltene Gesamt-RNA wurde zur Transkription mithilfe des *Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kits* (Tabelle 2-4) nach Herstelleranweisung eingesetzt. Zunächst wurde die Gesamt-RNA nach folgendem Schema vorinkubiert und für 10 min bei 65 °C denaturiert:

Tabelle 2-31: Pipettierschema für den RNA-Primer-Mix.

Komponente	Endkonzentration
Gesamt-RNA	1-4 µg
Anchored-oligo(dT)18 Primer (50 pmol/µl)	2,5 µM
$Wasser_{bidest.}$	ad 11,4 µl

Nach Abkühlen auf Eis wurden die folgenden Komponenten bis zu einem Gesamtvolumen von 20 µl in der angegebenen Reihenfolge hinzugefügt:

Tabelle 2-32: Pipettierschema für RT-Reaktion.

Komponente	Endkonzentration
5× *Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer*	1× (8 mM $MgCl_2$)
Protector RNase Inhibitor (40 U/µl)	20 U
Desoxynukleotid-Mix (je 10 mM)	je 1 mM
DTT (100 mM)	5 mM
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase	10 U

Die Komponenten wurden vorsichtig gemischt und zur Transkription für 30 min bei 50 °C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde anschließend bei 85 °C für 5 min inaktiviert und der Ansatz auf Eis abgekühlt. Die erhaltene cDNA wurde direkt in einer PCR (Tabelle 2-33) eingesetzt, um die codierende Sequenz von *CHGG_03684* zu erhalten. Hierfür fand wiederum das *Expand™ High Fidelity PCR System Kit* Anwendung.

Tabelle 2-33: Bedingungen für Amplifikation von *CHGG_03684* aus cDNA.

Bestandteil	Konzentration/Volumen	Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
cDNA	5 µl	Initiale Denaturierung	94	2:00	1
Primer (10 pmol/µl)	je 0,2 µM	Denaturierung	94	0:30	30
dNTP Mix (je 10 mM)	je 0,2 mM	Anlagerung	62	1:00	
10× Puffer	1×	Elongation	72	1:30	
High Fidelity Polymerase	2,5 U	Finale Elongation	72	7:00	1
		Kühlung	4	∞	1

2.5.11 DNA-Sequenzierung und bioinformatische Analysen

Sequenzierungen wurden mit ligierten Gensequenzen in Vektoren als Auftragsarbeiten von den Firmen Eurofins MWG (Ebersberg) und Seqlab (Göttingen) durchgeführt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Sequenzen sowie Exon-Intron-Vorhersagen beruhen auf Daten des *Broad Institute*[9] und des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI)[10] sowie auf Analysen der Software FGENESH 2.6 (Softberry, Mount Kisco, NY, USA)[11]. Sequenzen wurden mit dem Programm DNASIS (Version 2.1, Hitachi Software Engineering, San Bruno, CA, USA) betrachtet und bearbeitet.

Alignments zur Bestimmung der Sequenzidentitäten wurden mit BLAST (bl2seq) (*Basic Local Alignment Search Tool*)[12] (Altschul *et al.,* 1990) erstellt, Alignments mit mehreren Aminosäuresequenzen mit Clustal Omega[13] (Sievers *et al.,* 2011) oder mit dem ClustalO-Plugin der Software CLC *Sequence Viewer* (Version 7.0; CLC bio, Qiagen, Hilden).

Plasmidkarten wurden mithilfe der Software GENtle (Version 1.9.4; Magnus Manske, Universität Köln) erstellt.

Proteinkristallstrukturen stammen aus der *Protein Data Bank* (PDB)[14] (Berman *et al.,* 2000) und wurden mit PyMOL™ 1.7 (http://www.pymol.org/) betrachtet.

2.5.12 Heterologe Genexpression

2.5.12.1 Expression von *astPT* (*ATEG_09980*)

Die Überproduktion von AstPT-His_6 wurde in *E. coli* XL1-Blue MRF'-Zellen durchgeführt, die das Expressionsplasmid pST24 trugen. Als Kulturmedium diente LB-Medium (Tabelle 2-11) mit Carbenicillin (Tabelle 2-13). 1000 ml LB-Medium wurden mit 2%

[9] http://www.broadinstitute.org
[10] http://www.ncbi.nlm.nih.gov
[11] http://linux1.softberry.com
[12] http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
[13] http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/
[14] http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do

(v/v) einer Übernachtkultur angeimpft und für 6 h bei 37 °C und 220 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Kultur heruntergekühlt und für weitere 16 h bei 30 °C und 220 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000× *g*, 10 min, 4 °C) geerntet, in Lysepuffer (Tabelle 2-18) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.12.2 Expression von *ATEG_00702*

Zur Überproduktion von His_8-EAU39348 wurden *E. coli* BL21 (DE3) pLysS-Zellen, die das Expressionsplasmid pST37 trugen, in LB-Medium (Tabelle 2-11) mit Carbenicillin und Kanamycin (Tabelle 2-13) kultiviert. 1000 ml LB-Medium wurden mit 2% (v/v) einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Die Kultur wurde heruntergekühlt und die Überproduktion durch Zusatz von 0,1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 16 h Inkubation bei 22 °C und 220 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000× *g*, 10 min, 4 °C) geerntet, in Lysepuffer (Tabelle 2-18) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.12.3 Expression von *CHGG_03684* in *E. coli* ArcticExpress

Die Überproduktion von EAQ91749 wurde mit pST20 unter anderem auch in *E. coli* ArcticExpress RIL und ArcticExpress (DE3) RIL getestet. Dazu wurden Vorkulturen in LB-Flüssigmedium (Tabelle 2-11) mit Kanamycin- und Gentamycin-Zusatz (Tabelle 2-13) bei 37 °C und 220 rpm angesetzt. 2% (v/v) dieser Kulturen wurde zur Inokulierung von frischem LB-Medium verwendet, das anschließend für drei Stunden bei 30 °C und 220 rpm weiter inkubiert wurde. Nach Abkühlen der Kulturen auf 12 °C erfolgte die Induktion mittels IPTG-Zugabe und die Expression bei 12 °C und 220 rpm für mindestens 24 h. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000× *g*, 10 min, 4 °C) geerntet, in Lysepuffer (Tabelle 2-18) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.12.4 Expression von *ftmPT1* und mutierten Derivaten

E. coli XL1-Blue MRF'-Zellen, die das jeweilige Plasmid trugen, wurden in LB-Medium (Tabelle 2-11) mit Carbenicillin (Tabelle 2-13) kultiviert (Grundmann & Li 2005). 1000 ml LB-Medium wurden mit 2% (v/v) einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,7 inkubiert. Die Kultur wurde heruntergekühlt und die Überproduktion durch Zusatz von 0,1 mM IPTG induziert. Nach weiteren 16 h Inkubation bei 30 °C und 220 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000× *g*, 10 min, 4 °C) geerntet, in Lysepuffer (Tabelle 2-18) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.12.5 Expression von *cdpC3PT* und mutierten Derivaten

E. coli XL1-Blue MRF'-Zellen, die das jeweilige Plasmid trugen, wurden in LB-Medium (Tabelle 2-11) mit Carbenicillin (Tabelle 2-13) kultiviert (Yin *et al.,* 2010). 1000 ml LB-Medium wurden mit 2% (v/v) einer Übernachtkultur angeimpft und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 inkubiert. Die Überproduktion wurde durch Zusatz von 0,5 mM IPTG induziert. Nach weiteren 6 h Inkubation bei 37 °C und 220 rpm wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000× *g*, 10 min, 4 °C) geerntet, in Lysepuffer (Tabelle 2-18) resuspendiert und bei -20 °C gelagert.

2.5.12.6 Expressionsversuche von rekombinanten Proteinen in *S. cerevisiae* INVSc1

Die Überexpression von Proteinen in *S. cerevisiae* wurde nach dem Protokoll des Herstellers der pYES2/NT-Vektoren (Invitrogen, jetzt Life Technologies, Darmstadt) durchgeführt.

500 ml SC-U-Medium (Tabelle 2-12) mit 2% (w/v) Glucose wurden mit Plasmid-tragenden Zellen angeimpft. Nach Kultivierung über Nacht bei 30 °C und 280 rpm wurde die OD_{600} bestimmt und so viel Kultur abzentrifugiert (1500× *g*, 5 min, 4 °C) und in 1000 ml Induktionsmedium [SC-U mit 2% (w/v) Galactose und 1% (w/v) Raffinose] resuspendiert, dass sich eine OD_{600} von 0,4 ergab. Dazu wurde folgende Formel verwendet:

Formel 2-4: Berechnung des benötigten Kulturvolumens v zur Inokulierung von 1000 ml Medium.
x = gemessene OD_{600} (nach Herstellerangaben).

$$\mathrm{v\ [ml]} = \frac{(0{,}4\ \mathrm{OD/ml}) \times 1000\ \mathrm{ml}}{\mathrm{x\ OD/ml}}$$

Die Kultur wurde für etwa 24 h bei 30 °C und 250 rpm weiter inkubiert. Nach dem Ernten durch Zentrifugation (1500× *g*, 5 min, 4 °C) wurden die Zellen bei -20 °C gelagert.

2.6 Methoden der Biochemie

2.6.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten

2.6.1.1 Gewinnung von Proteinrohextrakten aus *E. coli*

Die Gewinnung von Proteinrohextrakten wurde nach Protokoll 9 der Herstelleranleitung QIAexpressionist™ (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

Nach erfolgter Überproduktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000× *g*) geerntet, in Lysepuffer (1 ml je g Feuchtmasse, Tabelle 2-18) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Bei Bedarf, vor allem bei Verwendung von *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, wurden

DNase I (5 µg/ml) und RNase A (10 µg/ml) zugegeben und weitere 10 min inkubiert. Nach der Lyse wurden die Zellen zusätzlich mit dem Sonifier 250 6 Mal für jeweils 10 s bei 200-300 W auf Eis aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend für 30 min bei 20000× *g* und 4 °C zentrifugiert.

2.6.1.2 Gewinnung von GST-*tag*-Proteinrohextrakten aus *E. coli* BL21 (DE3) pLysS

Nach erfolgter Überproduktion wurden die Zellen durch Zentrifugation (4000× *g*) geerntet, in 1× PBS (1 ml je g Feuchtmasse, Tabelle 2-19) resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Bei Bedarf wurden DNase I (5 µg/ml) und RNase A (10 µg/ml) zugegeben und weitere 10 min inkubiert. Nach der Lyse wurden die Zellen zusätzlich mit dem Sonifier 250 6 Mal für jeweils 10 s bei 200-300 W auf Eis aufgeschlossen. Die Suspension wurde anschließend für 30 min bei 20000× *g* und 4 °C zentrifugiert.

2.6.1.3 Gewinnung von überproduzierten Proteinen in Einschlusskörpern aus *E. coli* XL1-Blue MRF‘

pST18-tragende *E. coli* XL1-Blue MRF‘ wurden in 100 ml LB-Medium mit Carbenicillin (Tabelle 2-13) über Nacht kultiviert. 2% (v/v) dieser Kultur wurden zur Inokulierung von 1000 ml LB-Medium (Tabelle 2-11) mit Carbenicillin (Tabelle 2-13) in einem 2000 ml-Erlenmeyerkolben verwendet und bei 37 °C und 220 rpm bis zu einer OD_{600} von 0,6 kultiviert. Um eine möglichst hohe Ausbeute an Protein zu erhalten, wurde die Überproduktion mit 1 mM IPTG über Nacht bei 37 °C und 220 rpm induziert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (4000× *g*) geerntet, in Lysepuffer (1 ml je g Feuchtmasse, Tabelle 2-18) resuspendiert, mit 5 mg Lysozym versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach Ultraschall-aufschluss mit dem Sonifier 250 (6 Mal für jeweils 10 s bei 200-300 W auf Eis) wurde für 30 min bei 20000× *g* und 4 °C zentrifugiert und das Pellet bei -20 °C gelagert.

2.6.1.4 Gewinnung von Proteinrohextrakten aus *S. cerevisiae* INVSc1

Die unter 2.5.12.6 erhaltenen Zellen wurden aufgetaut und über eine Kanüle in eine Spritze aufgezogen. Danach wurde die Zellsuspension in einem vorgekühlten Mörser in flüssigen Stickstoff eingespritzt und zu einem feinen Pulver verrieben. Das Pulver wurde mit 10 ml kaltem *Yeast breaking buffer* versetzt und für mindestens eine Stunde gerührt. Anschließend wurde für 15 min bei 5000× *g* und 4 °C zentrifugiert. Der gewonnene Überstand wurde zur Aufreinigung von rekombinanten Proteinen mit Ni-NTA-Agarose (Tabelle 2-3) versetzt.

2.6.2 Reinigung von Proteinen

2.6.2.1 Reinigung von His-*tag*-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung von His-*tag*-Fusionsproteinen mittels Ni-NTA-Agarose wurde nach Protokoll 12 der Herstelleranleitung QIAexpressionist™ (Qiagen, Hilden) durchgeführt. Es wurden die in Tabelle 2-18 beschriebenen Puffer verwendet.

Der in 2.5.12 gewonnene Proteinrohextrakt wurde mit 200-250 µl Ni-NTA-Agarose (Tabelle 2-3) versetzt und mindestens 1 h auf Eis gerührt. Die Suspension wurde anschließend in eine leere Hülse überführt und der Durchfluss verworfen. Die Ni-NTA-Agarose mit anheftendem Protein wurde zweimal mit 4 ml Waschpuffer gewaschen und das überproduzierte His-*tag*-Fusionsprotein dreimal mit 2,5 ml Elutionspuffer eluiert. Die einzelnen Elutionsfraktionen wurden über eine Sephadex™ G 25 PD-10-Säule in Aufbewahrungspuffer umgepuffert und bei -80 °C gelagert.

Für die Reinigung von His_8-EAU39348 schloss sich nach Elution von der Ni-NTA-Agarose ein zusätzlicher Reinigungsschritt mittels HisPur™ *Cobalt Resin* (Tabelle 2-3) an. His_8-EAU39348 wurde zunächst zur quantitativen Entfernung von der Ni-NTA-Agarose dreimal mit Elutionspuffer vor der Säule gewaschen. Die Elutionsfraktionen wurden vereinigt und mit Wasser auf eine Imidazolkonzentration von 10 mM verdünnt. 50 µl HisPur™ *Cobalt Resin* wurden zweimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen, anschließend zur den Elutionsfraktionen gegeben und für 1 h bei 4 °C gerührt. Die Suspension wurde anschließend in eine leere Hülse überführt und die Reinigung analog zur Ni-NTA-Agarose-Reinigung fortgesetzt.

2.6.2.2 Reinigung von GST-*tag*-Fusionsproteinen mittels Affinitätschromatographie

Die Reinigung von GST-*tag*-Fusionsproteinen wurde mittels *Glutathione Sepharose*™ nach Herstelleranweisungen (GE Healthcare, Freiburg) durchgeführt.

50 µl *Glutathione Sepharose 4 Fast Flow*-Harz wurden mit 1× PBS (Tabelle 2-19) gewaschen und zum in 2.6.1.2 erhaltenen Proteinrohextrakt gegeben. Die Suspension wurde für mindestens 30 min bei Raumtemperatur gerührt und anschließend auf eine leere Säulenhülse überführt. Das Harz wurde dreimal mit je 500 µl 1× PBS gewaschen und bei verschlossener Säule mit 250 µl Elutionspuffer (Tabelle 2-19) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Säule wurde schließlich geöffnet, das eluierte Protein abgelassen und mittels SDS-PAGE (2.6.3) untersucht.

2.6.2.3 Reinigung von überexprimierten Proteinen aus Einschlusskörpern mittels N-Laurylsarkosin

Die Aufreinigung wurde nach einem Protokoll des *Protein Refolding Manual* von Novagen durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-20 aufgeführt.

Wie in 2.6.1.3 beschrieben wurden Zellen geerntet und das Pellet anschließend aber in 0,1 Kultur-Vol. (100 ml) 1× IB-Waschpuffer resuspendiert, mit 1 mg/ml Lysozym versetzt und 15 min bei 37 °C und 60 rpm inkubiert. Nach Ultraschallaufschluss wurde zentrifugiert (10000× *g*, 10 min) und das Pellet in 100 ml 1× IB-Waschpuffer resuspendiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Vor der letzten Zentrifugation wurde das Taragewicht des Zentrifugationsgefäßes bestimmt. Der Überstand wurde sorgfältig entfernt und das Gewicht der Einschlusskörper bestimmt und diese daraufhin mit 1× IB Solubilisierungspuffer (mit 0,3% (v/v) N-Laurylsarkosin und 1 mM DTT) auf 10-20 mg/ml verdünnt. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min und Zentrifugation (10000× *g*, 10 min) wurden die solubilisierten Proteine im Überstand vorsichtig abgenommen und wie unter 2.6.2.4 beschrieben dialysiert.

2.6.2.4 Solubilisierung von überexprimierten Proteinen aus Einschlusskörpern und Renaturierung

Die Solubilisierung wurde nach einem abgewandelten Protokoll von Sutherland Maciver (*Department of Biomedical Sciences, University of Edinburgh*)[15] durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2-20 aufgeführt.

Das in 2.6.1.3 erhaltene Pellet wurde in 10 ml IB1 aufgenommen und 30 min bei Raumtemperatur gerührt. Die Suspension wurde zentrifugiert (20000× *g*, 4 °C, 20 min) und der Waschschritt dreimal mit jeweils 10 ml IB2 durchgeführt. Die durch Zentrifugation erhaltenen Einschlusskörper wurden in 10 ml Solubilisierungspuffer aufgenommen und wieder für 30 min gerührt. Die Suspension wurde mit 3,3 ml Wasser versetzt, um eine Endkonzentration von 6 M Harnstoff zu erreichen. Nach Zentrifugation wurde das Volumen des Überstandes bestimmt (ca. 10 ml) und die benötigte Länge (ca. 14 cm) ZelluTrans Dialysiermembran (aus regenerierter Cellulose, MWCO 12.000-14.000, Roth, Karlsruhe) berechnet. Der zugeschnittene Dialyseschlauch wurde 20 min in Wasser eingeweicht und anschließend mit dem Überstand befüllt. Die Renaturierung der solubilisierten Proteine und Entfernung der niedermolekularen Substanzen wurde durch eine Dialyse mit mindestens zwei Pufferwechseln nach folgendem Schema unterständigem Rühren bei 4 °C durchgeführt:

1) 700 ml 1× Dialysepuffer mit 0,1 mM DTT für 3 h
2) 700 ml 1× Dialysepuffer für 9 h (über Nacht)
3) 700 ml 1× Dialysepuffer für 3 h.

[15] http://www.bms.ed.ac.uk/research/others/smaciver/Protocols/Inclusions.htm, abgerufen am 05.02.2013.

Die erhaltene Lösung wurde aus dem Dialyseschlauch entnommen und wie unter 2.6.2.1 beschrieben einer Reinigung über Ni-NTA-Agarose unterzogen.

2.6.3 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlösungen wurden zur Beurteilung der Zusammensetzung mittels SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen im diskontinuierlichen System aufgetrennt (Laemmli 1970). Die dabei eingesetzten Lösungen sind unter Tabelle 2-17 aufgeführt. Verwendet wurden ein 4%iges Sammelgel zur Fokussierung der Proteine und ein 12%iges Trenngel, in dem die eigentliche Trennung nach der Molekülmasse stattfand. Die zu untersuchenden Proteinlösungen wurden mit 5× Probenpuffer auf Eis gemischt und anschließend für 5 min bei 100 °C denaturiert. Als Größenstandard wurde das *Low Molecular Weight Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (Tabelle 2-4) nach Herstelleranweisungen eingesetzt. Nach Auftragen der Proben wurde eine Spannung von 180 V angelegt und der Fortschritt der Elektrophorese anhand der Bromphenolblaubande verfolgt. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Gele für mindestens 30 min in Färbelösung geschwenkt und anschließend in Entfärbelösung so lange entfärbt, bis der Hintergrund der Gele ausreichend entfärbt war.

2.6.4 Bestimmung von Molekulargewicht und Konzentration von Proteinen

2.6.4.1 Bestimmung der Molekulargewichte und Konzentration mittels SDS-PAGE

Die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine (2.6.3) wurden über einen Vergleich mit dem mitaufgetrennten Größenstandard abgeschätzt. Das *LMW Calibration Kit for SDS Electrophoresis* (Tabelle 2-4) enthielt dabei folgende Proteine: Phophorylase b (97,0 kDa), Albumin (66,0 kDa), Ovalbumin (45,0 kDa), Carboanhydrase (30,0 kDa), Trypsin-Inhibitor (20,1 kDa) und α-Lactalbumin (14,4 kDa). Da der Größenstandard auch eine definierte Proteinmenge enthält, konnte durch einen Größenvergleich der Banden auch die Konzentration der zu untersuchenden Proteine abgeschätzt werden.

2.6.4.2 Bestimmung der nativen Molekulargewichte mittels Größenausschlusschromatographie

Zur Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von EAU29429-His_6 wurde das aufgereinigte Protein (2.6.2.1) einer Größenausschlusschromatographie mittels FPLC (*fast protein liquid chromatography*) unterzogen. Dabei fand eine HiLoad 16/60 Superdex 200 Fertigsäule (Tabelle 2-3) an einer ÄKTAprime™ plus Anlage (Tabelle 2-2) Anwendung, die

mit FPLC-Puffer (Tabelle 2-23) mit einer Flussrate von 1 ml/min bei 4 °C betrieben wurde. Für die Kalibrierung der Säule wurde das Gel Filtration *HMW and LMW Calibration Kit* (Tabelle 2-4) verwendet. Zur Erstellung der Kalibriergeraden dienten die Elutionsvolumina der Proteine Ferritin (440 kDa), Aldolase (158 kDa), Conalbumin (75 kDa), Ovalbumin, (43 kDa), Carbonanhydrase (29 kDa) und Ribonuclease A (13,7 kDa). Dextranblau 2000 (2000 kDa) diente der Bestimmung des Ausschlussvolumens. Eine halblogarithmische Auftragung der Molekulargewichte der Markerproteine gegen deren Wanderungsstrecken liefert eine Kalibierkurve, aus der die Molekulargewichte der zu untersuchenden Proteine bestimmt werden können.

2.6.4.3 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung des Gesamtproteins wurde nach einer Methode von M. M. Bradford (Bradford 1976) durchgeführt. Die verwendeten Lösungen sind unter Tabelle 2-23 aufgelistet.

Die zu vermessende Probe wurde mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und mit 1 ml 1× Bradford-Lösung versetzt. Nach 5 min Inkubation wurde die Absorption der Probe bei λ=595 nm vermessen. Zur Bestimmung der Konzentration diente eine Kalibriergerade, die mit aufsteigenden Mengen Bovinen Serumalbumins (BSA) zwischen 0 und 10 µg nach demselben Verfahren aufgenommen wurde.

2.6.5 Enzymatische Reaktionsansätze

Alle Enzymreaktionen zur Untersuchung der Proteinaktivität wurden in einem Endvolumen von 100 µl durchgeführt. Proteinlösungen wurden auf Eis aufgetaut. Alle Komponenten wurden auf Eis zusammen pipettiert und bei der angegebenen Temperatur im Heizblock (bei Inkubationszeiten unter 1 h) oder im Inkubationsschrank (bei Inkubationszeiten über 1 h) inkubiert. Reaktionsansätze zur Isolierung von enzymatischen Produkten wurden in einem Endvolumen von 5 bis 20 ml im Inkubationsschrank durchgeführt

2.6.5.1 Assays mit AstPT (EAU29429-His$_6$)

Standardreaktionsansätze zur Bestimmung der Aktivität enthielten 50 mM Tris•HCl (pH 7,5), 5 mM $CaCl_2$, 1 mM aromatisches Substrat, 2 mM DMAPP, GPP oder FPP und 20 µg AstPT. Die Inkubation fand für 1 oder 16 h bei 37 °C statt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Volumen Methanol gestoppt, das Protein durch Zentrifugation (17000× *g*, 15 min, 4 °C) entfernt und der Überstand mittels HPLC (2.8.1.2) vermessen. Im Falle von Bisindolylbenzochinonen und Xanthonderivaten wurden jeweils 0,5 mM aromatisches Substrat eingesetzt und die Reaktionsansätze direkt dreimal mit 2 Vol. Ethylacetat

ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und in der Vakuumzentrifuge (Tabelle 2-2) zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in 20 ml DMSO gelöst und mit 100 µl Acetonitril (Bisindolylbenzochinone), bzw. Methanol (Xanthonderivate) verdünnt.

Reaktionen zur Isolierung der enzymatischen Produkte enthielten 50 mM Tris•HCl (pH 7,5), 5 mM $CaCl_2$, 0,5 mM aromatisches Substrat, 2 mM DMAPP, GPP oder FPP und 4-5 mg AstPT in einem Reaktionsvolumen von 20 ml. Die Inkubation fand bei 37 °C für 2 oder 16 h statt. Anschließend wurde dreimal mit 2 Vol. Ethylacetat ausgeschüttelt, die organischen Phasen vereinigt und im Rotationsverdampfer (Tabelle 2-2) zur Trockne eingeengt. Der Rückstand wurde in Acetonitril (Bisindolylbenzochinone), bzw. Methanol (Xanthonderivate) gelöst und mittels HPLC (2.8.1.2) vermessen und aufgetrennt.

2.6.5.2 Assays mit His_8-EAU39348

Standardreaktionsansätze zur Bestimmung der Aktivität enthielten 50 mM Tris•HCl (pH 7,5), 5 mM $CaCl_2$, 1 mM aromatisches Substrat, 2 mM DMAPP und 6,3 µg His_8-EAU39348. Die Inkubation fand für 6 oder 16 h bei 37 °C statt. Nach Inkubation wurden die Reaktionsansätze analog zu 2.6.5.1 bearbeitet.

2.6.5.3 Assays mit FtmPT1 und mutierten Derivaten

Standardreaktionsansätze enthielten 50 mM Tris•HCl (pH 7,5), 5 mM $CaCl_2$, 1 mM aromatisches Substrat, 2 mM DMAPP und 5 µg FtmPT1-His_6 oder Mutanten. Die Inkubation fand für 1 oder 16 h bei 30 °C statt (Grundmann & Li 2005). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. Methanol gestoppt, das Protein durch Zentrifugation (17000× *g*, 15 min, 4 °C) entfernt und der Überstand mittels HPLC (2.8.1.5) vermessen.

Reaktionen zur Isolierung der enzymatischen Produkte enthielten 50 mM Tris•HCl (pH 7,5), 5 mM $CaCl_2$, 1 mM aromatisches Substrat, 2 mM DMAPP und 250-500 µg FtmPT1-His_6 oder Mutanten in einem Reaktionsvolumen von 5-10 ml. Die Inkubation fand für 16 h bei 30 °C statt.

2.6.5.4 Assays mit CdpC3PT und mutierten Derivaten

Standardreaktionsansätze enthielten 50 mM Tris•HCl (pH 7,5), 5 mM $CaCl_2$, 1 mM aromatisches Substrat, 2 mM DMAPP und 5-20 µg CdpC3PT-His_6 oder Mutanten. Die Inkubation fand für 1 oder 16 h bei 37 °C statt (Yin *et al.,* 2010). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 Vol. Methanol gestoppt, das Protein durch Zentrifugation (17000× *g*, 15 min, 4 °C) entfernt und der Überstand mittels HPLC (2.8.1) vermessen.

2.7 Isolierung von Sekundärmetaboliten aus Ascomyceten

Ascomyceten wurden in Flüssigmedien unter den jeweiligen Bedingungen (2.4.2) im 100 ml-Maßstab in 300 ml-Erlenmeyerkolben ohne Schikanen bei 120-140 rpm kultiviert. Stämme von *A. terreus* wurden zehn Tage kultiviert, Stämme von *A. niger* 15 Tage. Anschließend wurde das Mycel durch Filtration vom Medium getrennt. Das Mycel wurde mit 100 ml Ethylacetat versetzt und für 1 h bei 220 rpm extrahiert. Das Ethylacetat wurde abgenommen und am Vakuumrotationsverdampfer bei max. 37 °C zur Trockne eingeengt. Das Kulturfiltrat wurde im Scheidetrichter dreimal mit jeweils 100 ml Ethylacetat ausgeschüttelt. Die vereinigten, organischen Phasen wurden über Natriumsulfat getrocknet und am Vakuumrotationsverdampfer bei max. 37 °C zur Trockne eingeengt. Die erhaltenen Rohextrakte wurden gewogen und in Acetonitril oder Methanol zurückgelöst und mittels HPLC (0, 2.8.1.4) untersucht. Die Lagerung der getrockneten Extrakte erfolgte bei -20 °C.

2.8 Analytische Methoden

2.8.1 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

2.8.1.1 Geräte, Säulen, Fließmittel

Alle HPLC-Analysen der vorliegenden Arbeit wurden an Anlagen der 1200-Serie der Firma Agilent (Santa Clara, CA, USA) durchgeführt. Zu analytischen Zwecken fand eine Multospher RP-18-Säule (250 mm × 4 mm, Partikelgröße 5 µm, C&S Chromatographie Service, Langerwehe) Anwendung, der eine mit Multoprep RP-18 gefüllte Vorsäule (30 mm × 4 mm, Partikelgröße 40 µm, C&S Chromatographie Service) vorgeschaltet war. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 1 ml/min betrieben. Zu semipräparativen Zwecken wurde, sofern nicht anders beschrieben, eine Multospher 120 RP-18-Säule (250 mm × 10 mm, Partikelgröße 5 µm, C&S Chromatographie Service) mit einer mit Multoprep RP 18 gefüllten Vorsäule (50 mm × 10 mm, Partikelgröße 40 µm, C&S Chromatographie Service) angewendet. Die Flussrate hierbei betrug 2,5-3 ml/min. Die Detektion erfolgte mittels DAD-Durchflussdetektor bei λ=254 oder 277 nm. Steuerung und Auswertung wurden mithilfe der *ChemStation* Software (Agilent) durchgeführt. Zur Trennung niedermolekularer Substanzen wurden hauptsächlich Zweikomponenten-Gradientsysteme mit den in Tabelle 2-34 aufgeführten Fließmitteln eingesetzt.

Tabelle 2-34: Fließmittel zur Trennung niedermolekularer Substanzen mittels HPLC.

Bezeichnung	Bestandteile
A	$Wasser_{bidest.}$
B	$Wasser_{bidest.}$ + 0,1% (v/v) TFA
C	Acetonitril
D	Acetonitril + 0,075% (v/v) TFA
E	Methanol
F	50% (v/v) Methanol in $Wasser_{bidest.}$
G	$Wasser_{bidest.}$ + 0,5% (v/v) TFA
H	Methanol + 0,5% (v/v) TFA

2.8.1.2 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte von AstPT

2.8.1.2.1 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte von AstPT mit Asterrichinon D

Zur Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte mit Asterrichinon D wurden die Fließmittel A und C (Tabelle 2-34) eingesetzt. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen wurde bei λ=277 nm durchgeführt. Der Umsatz der Reaktion wurde über die Abnahme der Substratkonzentration berechnet.

Tabelle 2-35: Gradient zur Analytik von Asterrichinon D und enzymatischen Produkten; Säule: 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel C [%]	Flussrate [ml/min]
0	50	1
20	100	1
25	100	1
25,1	50	1
30	50	1

Tabelle 2-36: Gradient zur Isolierung von enzymatischen Produkten mit Asterrichinon D.

Zeit [min]	Lösungsmittel C [%]	Flussrate [ml/min]
0	70	2,5
2	70	2,5
20	100	2,5
25	100	2,5
25,1	70	2,5
30	70	2,5

2.8.1.2.2 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte von AstPT mit Xanthonen

Zur Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte mit Xanthonen wurden die Fließmittel A und E (Tabelle 2-34) eingesetzt. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen wurde bei λ=254 nm durchgeführt.

Tabelle 2-37: Gradient zur Analytik von Xanthonen und enzymatischen Produkten; Säule. 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	65	1
20	100	1
25	100	1
25,1	65	1
30	65	1

Tabelle 2-38: Gradient zur Isolierung von enzymatischen Produkten von 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon und 1,3,6-Trihydroxyxanthon mit DMAPP; Säule. 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	65	1
20	100	1
25	100	1
25,1	65	1
30	65	1

Tabelle 2-39: Gradient zur Isolierung von enzymatischen Produkten von 1,3,7-Trihydroxyxanthon mit DMAPP und 1,3,6-Trihydroxyxanthon mit GPP; Säule. 250 mm × 10 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	80	2,5
15	100	2,5
25	100	2,5
25,1	80	2,5
30	80	2,5

Tabelle 2-40: Gradient zur Isolierung von enzymatischen Produkten von 1,3,6-Trihydroxyxanthon mit FPP und 1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon mit GPP; Säule. 250 mm × 10 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	90	3
2	90	3
15	100	3
20	100	3
20,1	90	3
25	90	3

Alle anderen Inkubationsgemische wurden mithilfe eines isokratischen Laufs mit 100% E mit einer Flussrate von 2,5 ml/min aufgetrennt. Die Läufe dauerten 20 min (für

Inkubationsgemische von 1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon mit FPP), 25 min (1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon mit GPP) oder 33 min (1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon mit FPP).

2.8.1.3 Analytik der Extrakte von *A. terreus* DSM 1958 und A1156.

Zur Analytik der Extrakte von *A. terreus* wurden die Fließmittel A und C (Tabelle 2-34) eingesetzt. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen wurde bei λ=277 nm durchgeführt.

Tabelle 2-41: Gradient zur Analytik von Extrakten von *A. terreus*; Säule: 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel D [%]	Flussrate [ml/min]
0	10	1
20	100	1
25	100	1
25,1	10	1
30	10	1

2.8.1.4 Analytik der Extrakte von *A. niger* AB1.13 und Transformanten

Zur Analytik der Extrakte von *A. niger* AB 1.13 und Transformanten wurden die Fließmittel A und C (Tabelle 2-34) eingesetzt. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen wurde bei λ=277 nm durchgeführt.

Tabelle 2-42: Gradient zur Analytik von Extrakten von *A. niger* AB 1.13 und Transformanten; Säule: 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel D [%]	Flussrate [ml/min]
0	10	1
20	100	1
25	100	1
25,1	10	1
30	10	1

2.8.1.5 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte von FtmPT1 und mutierten Derivaten

Zur Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte von FtmPT1 und Mutanten wurden die Fließmittel F und E (Tabelle 2-34) eingesetzt. Zur Isolierung der enzymatischen Produkte von FtmPT1_Y205F mit Naphthalinderivaten wurde zusätzlich eine Methode mit den Fließmitteln G und H (Tabelle 2-34) genutzt. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen wurde bei λ=254 nm durchgeführt.

Tabelle 2-43: Gradient zur Analytik von Inkubationen von FtmPT1 und mutierten Derivaten; Säule: 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	40	1
12	70	1
12,1	100	1
20	100	1
20,1	40	1
25	40	1

Tabelle 2-44: Gradient zur Isolierung von enzymatischen Produkten von FtmPT1 und mutierten Derivaten; Säule: 250 mm × 10 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	40	2,5
12	70	2,5
12,1	100	2,5
20	100	2,5
20,1	40	2,5
30	40	2,5

Tabelle 2-45: Gradient zur Isolierung des enzymatischen Produktes von FtmPT1_G115T mit Brevianamid F; Säule: 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	50	1
2	50	1
15	70	1
15,1	100	1
20	100	1
20,1	50	1
25	50	1

Tabelle 2-46: Gradient zur Isolierung der enzymatischen Produkte von FtmPT1_Y205F mit Naphthalinderivaten; Säule: 250 mm × 10 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel H [%]	Flussrate [ml/min]
0	65	2,5
15	100	2,5
25	100	2,5
25,1	65	2,5
30	65	2,5

2.8.1.6 Analytik und Isolierung der enzymatischen Produkte von CdpC3PT und mutierten Derivaten

Zur Analytik der enzymatischen Produkte von CdpC3PT und Mutanten mit cyclischen Dipeptiden wurden die Fließmittel F und E (Tabelle 2-34) eingesetzt, zur Analytik der enzymatischen Produkte mit Naphthalinderivaten die Fließmittel G und H. Die Detektion der aufgetrennten Substanzen wurde bei λ=254 nm durchgeführt.

Tabelle 2-47: Gradient zur Analytik von CdpC3PT und mutierten Derivaten mit cyclischen Dipeptiden; Säule: 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel E [%]	Flussrate [ml/min]
0	40	1
12	70	1
12,1	100	1
20	100	1
20,1	40	1
25	40	1

Tabelle 2-48: Gradient zur Analytik von CdpC3PT und mutierten Derivaten mit Hydroxynaphthalin-derivaten; Säule: 250 mm × 4 mm.

Zeit [min]	Lösungsmittel H [%]	Flussrate [ml/min]
0	50	1
20	100	1
25	100	1
25,1	50	1
30	500	1

2.8.2 Chiroptische spektroskopische Methoden

2.8.2.1 CD-Spektroskopie

Im Rahmen der Mutationsexperimente mit Prenyltransferasen wurden von FtmPT1 und Mutanten CD-Spektren aufgenommen. Mithilfe des Circulardichroismus lässt sich feststellen, ob Proteine, in diesem Fall also der Wildtyp und verschiedene Mutanten von FtmPT1 dieselbe Konformation besitzen. Dies ist möglich, da α-Helices, β-Faltblatt- und *random-coil*-Strukturen unterschiedliche Spektren liefern. Die Messungen wurden durchgeführt um auszuschließen, dass etwaige Aktivitätsverluste auf einer veränderten Faltung der Mutanten beruhen. Vermessen wurden Proteinlösungen in 50 mM Tris·HCl (pH 7,5), wobei pro Messung ca. 100 µg Protein eingesetzt wurden. Die Lösungen wurden bei 4 °C verdünnt und sofort vermessen.

Tabelle 2-49: Für die CD-Spektroskopie verwendete Geräte und Materialien.

Bezeichnung	Hersteller
J-810 Spectrometer	JASCO, Easton, MD, USA
Präzisionsküvette aus Quarzglas (Suprasil) Typ 110-QS mit Stopfen, 1 mm Schichtdicke, 350 µl Fassungsvolumen	Hellma, Müllheim

Tabelle 2-50: Am J-810 Spectrometer eingestellte Parameter zur CD-Messung von Proteinlösungen.

Parameter	Einstellung
Sensitivity	Standard (100 mdeg)
Start	270 nm
End	170 nm
Data Pitch	0,1 nm
Scanning Mode	Continuous
Speed	200 nm/min
Response	0,5 s
Band Width	1 nm
Accumulation	5
Temperature	4 °C

2.8.3 Massenspektrometrie (MS)

Proben zur MS- und HR-MS-Analyse wurden in Methanol gelöst und an einem AutoSpec-Gerät (Micromass, Manchester, UK) durch Frau Dr. Gabriela Laufenberg und Frau Nina Zitzer vermessen. Die Proben wurden dabei mittels Elektronenstoßionisation (EI) oder Elektrosprayionisation (ESI) zugeführt.

2.8.4 Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC/MS)

Extrakte von Kulturen von Ascomyceten wurden in Acetonitril oder Methanol gelöst und an einem 1100 HPLC System (Agilent Technologies) aufgetrennt, das mit einem LTQ-FT Ultra Massenspektrometer (Thermo Fischer Scientific) gekoppelt war, bestehend aus einer linearen Ionenfalle (MS) und einer FT-ICR-Zelle (HR-MS). Als Fließmittel wurden Wasser und Acetonitril bei einer Flussrate von 1 ml/min verwendet. Die Trennung der Substanzen erfolgte wie bereits beschrieben (2.8.1). Die Messungen wurden von Herrn Dr. Uwe Linne und Herrn Jan Bamberger durchgeführt.

2.8.5 Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)

Zur Strukturaufklärung mittels NMR wurden aufgereinigte Substanzen mindestens eine Nacht im Gefriertrockner getrocknet und in einem deuterierten Lösungsmittel (Tabelle 2-1) aufgenommen. Die Messungen wurden an einem JEOL ECA-500 Spektrometer (JEOL, Akishima, Tokio, Japan) durch Frau Dr. Regina Ortmann, Herrn Dr. Thomas Kämpchen und Herrn Stefan Newel durchgeführt. Zur Aufnahme von $^{1}H/^{13}C$-HSQC- und $^{1}H/^{13}C$-HMBC-Spektren wurde 7-Farnesyloxy-1-hydroxy-6-methylxanthon in 0,30 ml DMSO-D_6 gelöst in an einem Avance 500 MHz Spektrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) durch Frau Dr. Xiulan Xie vermessen. Die Messungen im Rahmen der Untersuchungen der FtmPT1_G115T-Mutante, darunter $^{1}H/^{13}C$-HSQC- und $^{1}H/^{13}C$-HMBC- und $^{1}H/^{1}H$-NOESY-Spektren, wurden in 0,2 ml

Chloroform-D_1 an einem Avance 600 MHz Spektrometer (Bruker) durch Frau Dr. Xiulan Xie durchgeführt.

Die Auswertung der NMR-Daten erfolgte mit der Software TOPSPIN 2.1 (Bruker) oder MestReNova 6.0.2 (Metrelab Research, Santiago de Compostela, Spanien). Lösungsmittelsignale dienten dabei der Kalibrierung der chemischen Verschiebungen und sind in Tabelle 2-51 aufgelistet.

Tabelle 2-51: Lösungsmittelsignale (Fulmer *et al.,* 2010), die der Kalibrierung der chemischen Verschiebungen dienten.

Lösungsmittel	δ_H [ppm]	δ_C [ppm]
Aceton-D_6	2,05	-
Chloroform-D_1	7,26	77,16
DMSO-D_6	2,50	39,52
Methanol-D_4	3,31	-

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zu putativen Prenyltransferasen aus *Aspergillus terreus* und *Chaetomium globosum*

3.1.1. Einleitung

Seit der Entdeckung des Cochliodinols in *Chaetomium* sp. (Brewer *et al.,* 1968) konnten weitere Vertreter der Gruppe der Bisindolylbenzochinone unter anderem in *A. nidulans* (Bok *et al.*, 2006) und *A. terreus* (Yamamoto *et al.*, 1976b) nachgewiesen werden. Der großen Zahl an isolierten Verbindungen steht mit dem *tdi*-Cluster nur ein Beispiel für die Aufklärung der Biosynthese dieser Substanzen gegenüber (Balibar *et al.,* 2007; Schneider *et al.,* 2007; Schneider *et al.,* 2008b). BLAST-Analysen zeigten das Vorhandensein von zehn putativen Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie im Genom von *A. terreus* NIH 2624 und einer im Genom von *C. globosum* CBS 148.51 (Khaldi *et al.,* 2010). Zwei der Gene von *A. terreus*, *ATEG_00702* und *ATEG_09980* (*astPT*), zeigten eine Identität von 48% bzw. 45% zu TdiB auf Aminosäureebene (Schneider *et al.,* 2008b). Auch das Gen von *C. globosum*, *CHGG_03684*, zeigte eine Identität von 40% auf Aminosäureebene (Tabelle 3-1). Da beide Ascomyceten in der Lage sind prenylierte Bisindolylbenzochinone zu produzieren, wurde die genetische Umgebung der drei putativen Prenyltransferase-Gene untersucht. Es zeigte sich, dass das Genom von *A. terreus* und *C. globosum* mit jeweils vier Genen ein fast komplettes Cluster entsprechend dem *tdi*-Cluster enthält. Dabei sind jeweils die entsprechenden Gene *CHGG_03684*, *CHGG_03685*, *CHGG_03686* und *CHGG_03687* homolog zu *tdiB*, *tdiC*, *tdiD* und *tdiA*. *ATEG_00700*, *ATEG_00701*, *ATEG_00702* und *ATEG_00703* sind homolog zu *tdiA*, *tdiC*, *tdiB* und *tdiE* und *ATEG_09980* und *ATEG_09981* zu *tdiB* und *tdiC* (Abbildung 3-1).

Tabelle 3-1: Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene der drei putativen Prenyltransferasen mit TdiB und untereinander.

	TdiB	EAU29429	EAU39348
EAU29429	45		
EAU39348	48	71	
EAQ91749	40	37	38

Die Zahl der identischen Aminosäuren ist in Prozent angegeben.

Tabelle 3-2: Tdi-Homologe in *A. terreus* und *C. globosum* und vorhergesagte Domänen.

Gen	Protein	Domänen
ATEG_00700	EAU39346	NRPS-ähnlich, A-T-TE
ATEG_00701	EAU39347	Zinkabhängige Alkoholdehydrogenase
ATEG_00702	EAU39348	aromatische Prenyltransferase, DMATS-Typ
ATEG_00703	EAU39349	*O*-Methyltransferase
ATEG_09980	EAU29429	aromatische Prenyltransferase, DMATS-Typ
ATEG_09981	EAU29430	Zinkabhängige Alkoholdehydrogenase
CHGG_03684	EAQ91749	aromatische Prenyltransferase, DMATS-Typ
CHGG_03685	EAQ91750	Zinkabhängige Alkoholdehydrogenase
CHGG_03686	EAQ91751	Aminotransferase
CHGG_03687	EAQ91752	NRPS-ähnlich, A-T-TE

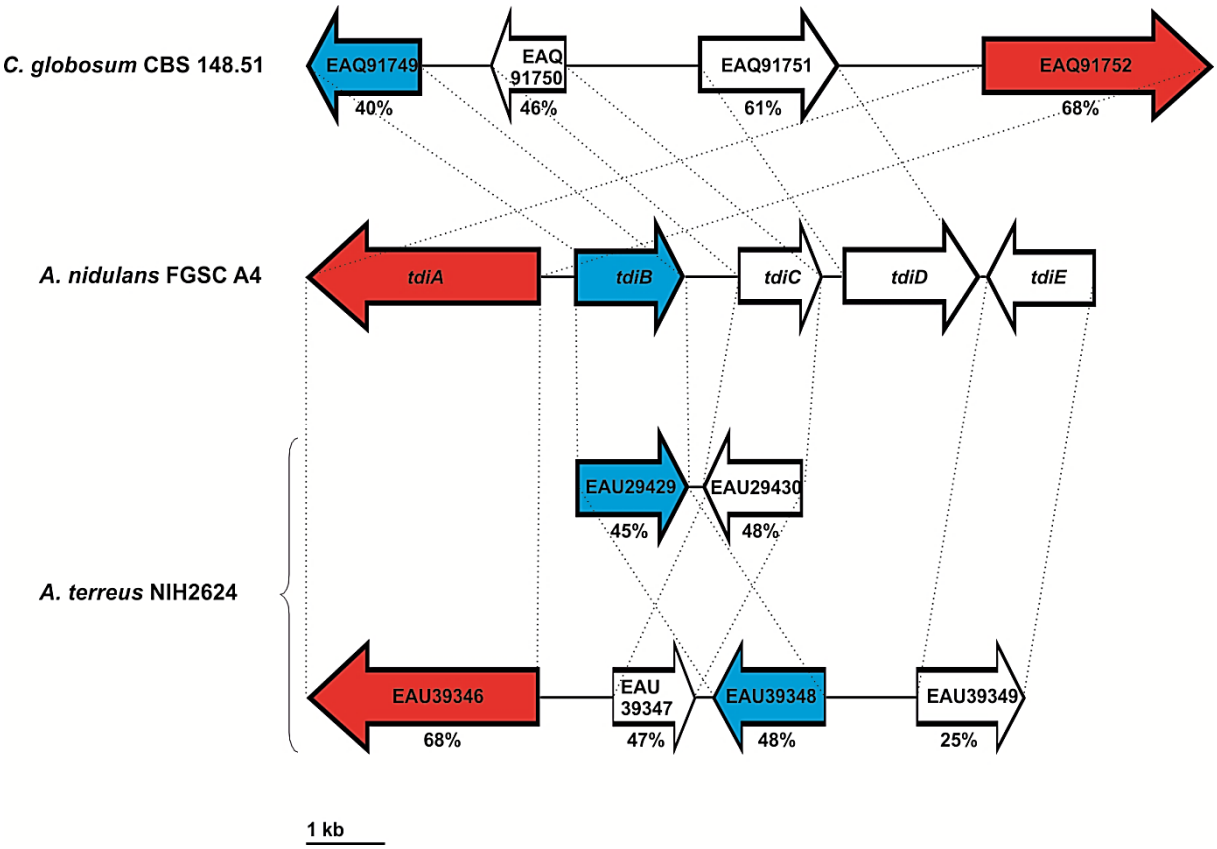


Abbildung 3-1: Struktureller Vergleich der biosynthetischen Gencluster in *A. terreus* und *C. globosum* mit dem *tdi*-Cluster aus *A. nidulans*. Pfeile geben die Größe der Gene und die Richtung der Transkription wieder. NRPS-ähnliche Gene sind rot dargestellt, Prenyltransferase-Gene blau. Die Sequenzähnlichkeiten zu Tdi-Proteinen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet und auf Aminosäureebene jeweils in Prozent angegeben. Exon-Intron-Strukturen sind nicht wiedergegeben.

Neben einem Anteil von identischen Aminosäuren zwischen 40-48% weisen die drei Prenyltransferase-Gene eine vergleichbare Genstruktur zu *tdiB* auf. Alle Gene bestehen jeweils aus drei Exons; die daraus resultierenden Proteine bestehen jeweils aus 401 bis 424 Aminosäuren (Tabelle 3-3). *CHGG_03684* weicht in den Verhältnissen zwischen den einzelnen Exon- und Intronstrukturen leicht von den beiden *A. terreus*-Genen ab; während Exon 1 etwa 15 bp größer ist, fehlen Exon 2 etwa 20 bp.

Tabelle 3-3: Exon-Intron-Struktur von *tdiB* und homologen Genen aus *A. terreus* und *C. globosum*.

Gen	Exon 1 [bp]	Intron 1 [bp]	Exon 2 [bp]	Intron 2 [bp]	Exon 3 [bp]	Protein (Aminosäuren)
ANID_08514	623	64	492	69	145	TdiB (419)
ATEG_00702	665	64	474	70	136	EAU39348 (424)
ATEG_09980	668	68	471	74	136	EAU29429 (AstPT) (424)
CHGG_03684	683	156	378	51	136	EAQ91749 (401)

Die Nummerierung der Exons und Intron beginnt jeweils am 5‘-Ende.

3.1.2. Charakterisierung der Prenyltransferase AstPT aus *Aspergillus terreus*

3.1.2.1. Amplifikation von *astPT* aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958

Basierend auf der ähnlichen Genstruktur zu *tdiB* wurde die codierende Sequenz von *astPT* aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958 amplifiziert. Dazu wurde zunächst jedes Exon getrennt amplifiziert und die gesamte codierende Sequenz schließlich durch Fusions-PCR erhalten. Das erste Exon wurde mittels Primerpaar ATEG_09980_1 und ATEG_09980_2, das zweite mittels Primerpaar ATEG_09980_3 und ATEG_09980_4 und das dritte Exon mittels Primerpaar ATEG_09980_5 und ATEG_09980_6 amplifiziert. ATEG_09980_2 und ATEG_09980_3 sowie ATEG_09980_4 und ATEG_09980_5 waren jeweils komplementär zueinander, sodass durch sie überlappende Bereiche eingeführt wurden, die zur Fusion der einzelnen Exons genutzt wurden. ATEG_09980_1 und ATEG_09980_6 führten dabei eine BamHI- bzw. eine BglII-Schnittstelle ein, die im weiteren Verlauf zur Klonierung genutzt werden sollte. Durch ATEG_09980_6 wurde außerdem das Stop-Codon zu einem Tyrosin mutiert, um bei einer späteren Überproduktion die Transkription und Translation eines C-terminalen His_6-*tags* zu ermöglichen. Abbildung 3-2 zeigt die Produkte der Amplifikationen der einzelnen Exons (A) und der Fusion von Exon 1 und 2 (B); unter (C) ist die gesamte codierende Sequenz mit einer Länge von 1290 bp zu erkennen.

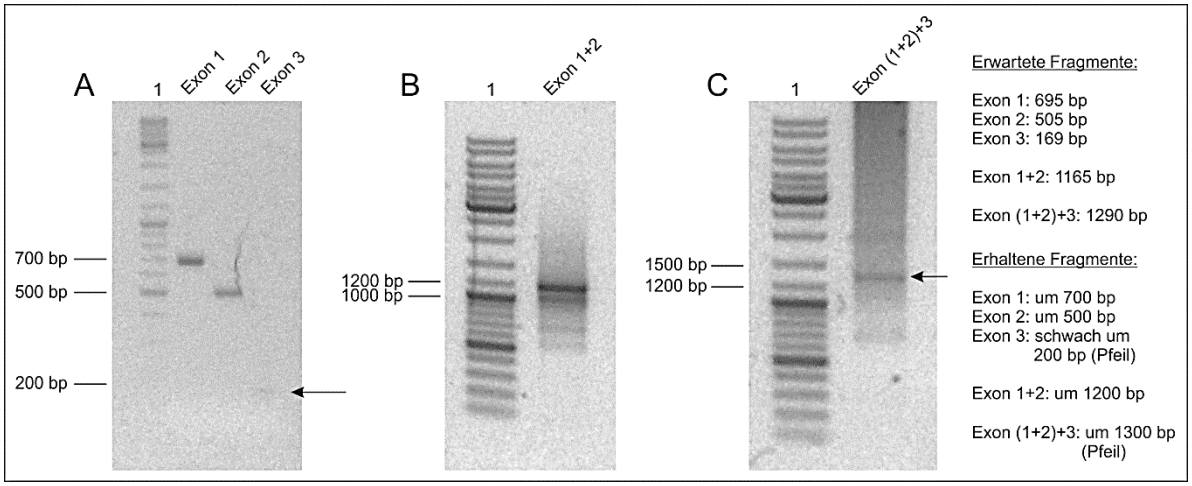


Abbildung 3-2: Agarosegele der PCR-Amplifikationen von *astPT* aus gDNA. A: 2%iges Agarosegel, Amplifikation der Exons 1, 2 und 3. B: 0,8%iges Agrosegel, Fusion der Exons 1 und 2. C: 0,8%iges Agrosegel, Fusion der Exons (1+2) mit Exon 3. Spur 1: jeweils DNA-Größenstandard.

3.1.2.2. Klonierung und Transformation

Die erfolgreich amplifizierte Sequenz von *astPT* wurde in den Klonierungsvektor pGEM®-T easy ligiert und zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF‘ mittels Hitzeschock verwendet. Durch Blau-Weiß-Selektion wurden negative Kolonien bereits aussortiert und mögliche positive Kolonien zur weiteren Untersuchung kultiviert. Die Plasmide wurden isoliert und einem Eco-RI-Verdau unterzogen. pST22 zeigte das erwartete Restriktionsmuster (Abbildung 3-3) und die korrekte Sequenz von *astPT* konnte durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

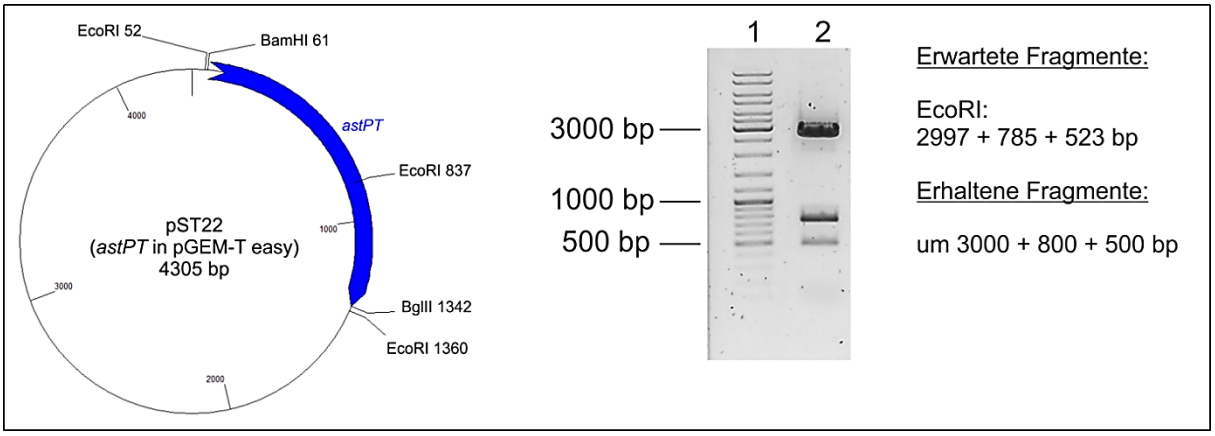


Abbildung 3-3: Vektorkarte von pST22 (*astPT* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. EcoRI diente der Restriktionskontrolle, BamHI und BglII wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: EcoRI-verdautes pST22.

pST22 und der Expressionsvektor pQE-70 wurden daraufhin einem Doppelverdau mit BamHI und BglII unterzogen. Da durch diese beiden Enzyme kompatible Enden entstehen, wurde pQE-70 zusätzlich mittels SAP dephoshoryliert. Die erhaltenen Fragmente, 1281 bp für *astPT* und 3419 bp für pQE-70, wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt, aufgereinigt und miteinander ligiert. Nach Transformation und Isolierung der Plasmide konnten drei Plasmide erhalten werden, die intakte Schnittstellen für BamHI und BglII erhielten, in denen das *astPT*-Fragment folglich in der korrekten Orientierung vorlag. Diese wurden zusätzlich mit EcoRI und XhoI untersucht und zeigten das erwartete Restriktionsmuster (Abbildung 3-4). pST24 wurde als Expressionskonstrukt ausgewählt und zur Überproduktion von AstPT-His_6 in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ transformiert.

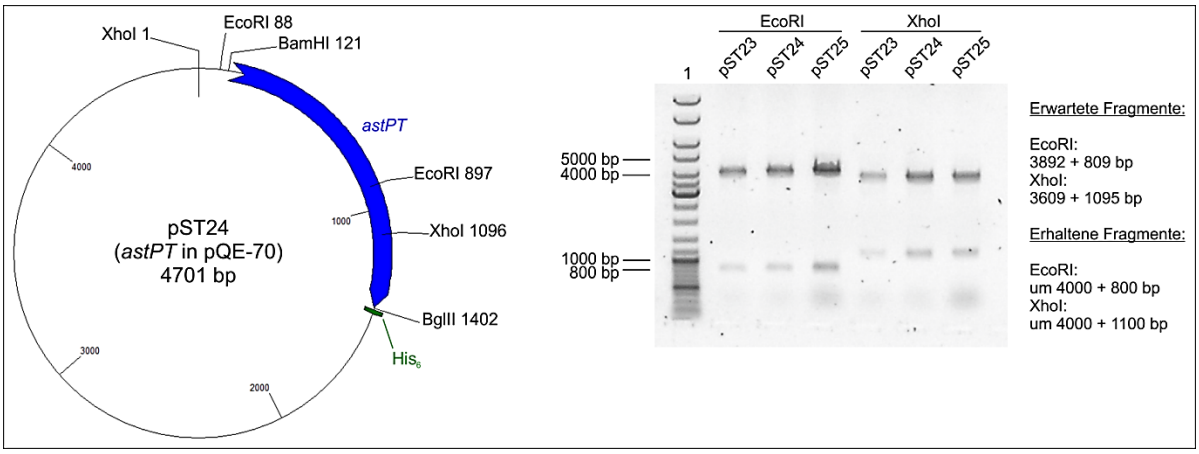


Abbildung 3-4: Vektorkarte von pST24 (*astPT* in pQE-70) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. EcoRI und XhoI dienten der Restriktionskontrolle, BamHI und BglII wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard.

3.1.2.3. Überproduktion und Reinigung von AstPT-His$_6$

Die Überproduktion von AstPT-His$_6$ wurde mit pST24 in *E. coli* XL1-Blue MRF' durchgeführt. Verwendet wurde LB-Medium, in dem die Zellen für 6 h bei 37 °C angezogen wurden. Nach Herunterkühlen auf 30 °C und weiterer Inkubation bei 30 °C für 16 h konnte das Protein mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt werden. Die Überproduktion erfolgte dabei ohne Zugabe des synthetischen Induktors IPTG, der auch in geringen Konzentrationen von 0,1 mM zur Bildung von hauptsächlich unlöslichem Protein führte. Die theoretische Größe des Proteins beträgt 48,9 kDa. Eine Analyse der während der Aufreinigung gewonnenen Fraktionen mittels SDS-PAGE zeigte, dass ein großer Anteil des Proteins weiterhin unlöslich verblieb (Abbildung 3-5). Die Ausbeute von mindestens 3 mg löslichem Protein je Liter Kultur war aber ausreichend für weitere Untersuchungen. Mithilfe der Größenausschlusschromatographie wurde das Molekulargewicht des nativen, rekombinanten Fusionsproteins bestimmt. AstPT-His$_6$ hatte ein Elutionsvolumen von 83 ml. Das Molekulargewicht wurde als 48,9 kDa bestimmt, was dafür spricht, dass AstPT als Monomer aktiv ist.

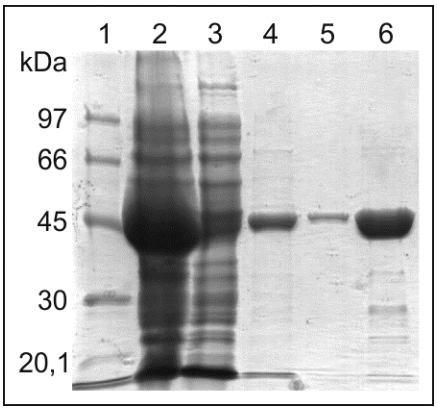


Abbildung 3-5: SDS-PAGE der Aufreinigung von AstPT-His$_6$ aus *E. coli* XL1-Blue MRF' (pST24). Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: unlösliches Gesamtprotein. Spur 3: Durchflussfraktion. Spur 4: erste Waschfraktion. Spur 5: zweite Waschfraktion. Spur 6: erste Elutionsfraktion.

3.1.2.4. Aktivitätstests mit AstPT und Vergleich mit TdiB

AstPT zeigt auf Aminosäureebene eine Identität von 45% zu TdiB, daher wurde vermutet, dass auch AstPT für die Prenylierung von Bisindolylbenzochinonen verantwortlich sein könnte. 20 µg des überproduzierten und aufgereinigten Proteins wurden mit 0,5 mM Asterrichinon D (AQ D, **1**) in Anwesenheit von 2 mM DMAPP und 5 mM $CaCl_2$ in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Extrahieren mit Ethylacetat abgestoppt. HPLC-Analysen zeigten das Auftreten von vier zusätzlichen Peaks (**2**-**5**), das nur bei Anwesenheit von DMAPP und intaktem Protein zu beobachten war (Abbildung 3-6, A). Die Reaktion wurde außerdem zu verschiedenen Zeiten abgestoppt und so konnte beobachtet werden, dass die Produkte **2** und **3** in der Anfangsphase der Reaktion die Hauptprodukte waren, deren Maximum etwa nach 25 min erreicht war (Abbildung 3-7). Im späteren Verlauf nahm die Menge dieser Produkte wieder ab. Die Konzentrationen der Produkte **4** und **5** nahmen dagegen stetig zu; sie bildeten letztlich auch die Hauptprodukte der Reaktion. Dies führte zu der Vermutung, dass **2** und **3** weiter umgesetzt wurden zu **4** und **5**.

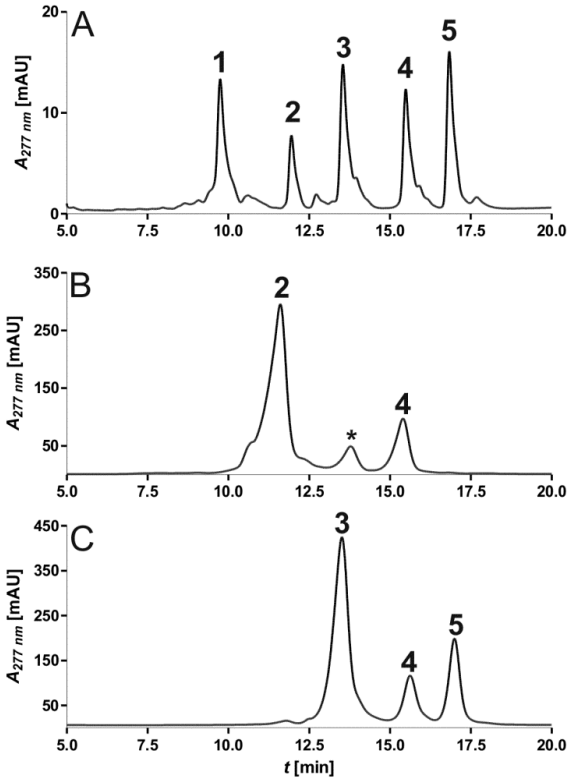


Abbildung 3-6: HPLC-Chromatogramme der Aktivitätstests von AstPT mit Asterrichinon D (1) (Tarcz *et al.,* 2014a). Alle Reaktionen wurden in Anwesenheit von 2 mM DMAPP bei 37 °C durchgeführt. A: Analyse der Inkubation von AstPT mit AQ D nach 1 h. B: Analyse der Inkubation von AstPT mit 2 nach 16 h. Stern markiert ein unbekanntes Produkt, dessen Struktur nicht aufgeklärt werden konnte. C: Analyse der Inkubation von AstPT mit 3 nach 16 h.

Um dies zu untersuchen, wurden die isolierten Produkte **2** und **3** mit AstPT in Anwesenheit von 2 mM DMAPP und 5 mM $CaCl_2$ in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) für 16 h bei 37 C inkubiert. Dabei konnten für jede Inkubation jeweils zwei zusätzliche Peaks beobachtet werden (Abbildung 3-6, B+C). Die Produkte aus der Inkubation von AstPT mit **3** konnten als **4** und **5** identifiziert werden, während die Inkubation mit **2** ebenfalls **4** und ein unbekanntes Produkt lieferte. Dieses hatte zwar eine ähnliche Retentionszeit wie **3**, war aber eindeutig nicht mit diesem identisch. Da die Ausbeute dieses Produktes nur gering war, war eine Strukturaufklärung leider nicht möglich. **3** und **5** scheinen dabei jeweils die dominierenden Produkte zu sein.

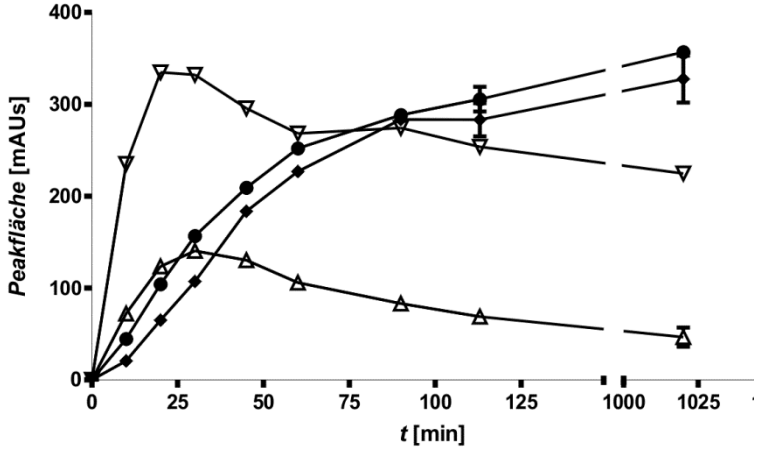
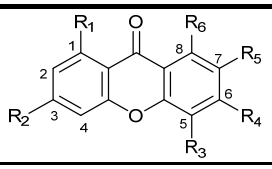


Abbildung 3-7: Abhängigkeit der Produktbildung durch AstPT von der Inkubationszeit. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt, die Abweichung ist durch Fehlerbalken dargestellt.

Neben DMAPP wurden auch GPP und FPP als Prenyldonoren getestet, allerdings konnte mit AQ D keine Umsetzung detektiert werden. Um die Substratspezifität der Bisindolylbenzochinon-PTasen zu vergleichen, wurde TdiB wie bereits beschrieben (Schneider *et al.,* 2008b) überproduziert, aufgereinigt und auf seine Aktivität bezüglich AQ D getestet. Auch nach 16 h Inkubation war weder mit DMAPP noch mit GPP oder FPP eine Umsetzung detektierbar, was zumindest für TdiB auf eine hohe Substratspezifität schließen lässt.

Da mit XptB bereits eine pilzliche Prenyltransferase vorlag, die Hydroxyxanthone akzeptiert (Pockrandt *et al.,* 2012), wurde die Aktivität von AstPT an Xanthon und zehn hydroxylierten Derivaten getestet. Die Inkubationen wurden mit jeweils 20 µg rekombinantem Protein in Anwesenheit von DMAPP, GPP und FPP für 16 h bei 37 °C durchgeführt. Die Auswertung der HPLC-Chromatogramme zeigte, dass vier der getesteten Substrate durch AstPT akzeptiert wurden, sowohl in Anwesenheit von DMAPP als auch von GPP und FPP (Tabelle 3-4). Verglichen mit Reaktionsansätzen mit hitzeinaktiviertem Protein, wo keine Produktbildung zu beobachten war, war in allen Chromatogrammen der Inkubationen von 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (**6a**), 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**7a**) und 1,3,7-Trihydroxyxan-

Tabelle 3-4: Getestete Xanthonderivate und absolute Umsetzung.

							Absolute Umsetzung [%]		
Substrat	**R_1**	**R_2**	**R_3**	**R_4**	**R_5**	**R_6**	**DMAPP**	**GPP**	**FPP**
Xanthon	H	H	H	H	H	H	< 0,1	n.b.	n.b.
3-Hydroxyxanthon	H	OH	H	H	H	H	< 0,1	n.b.	n.b.
1-Hydroxy-6,8-dimethylxanthon	OH	H	H	CH_3	H	CH_3	0,3	n.b.	n.b.
1,3-Dihydroxyxanthon	OH	OH	H	H	H	H	0,9	n.b.	n.b.
1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (**6a**)	OH	H	H	CH_3	OH	H	23,1	26,1	18,8
1,7-Dihydroxy-6,8-dimethylxanthon	OH	H	H	CH_3	OH	CH_3	< 0,1	n.b.	n.b.
1,7-Dihydroxy-5,6,8-trimethyl-xanthon	OH	H	CH_3	CH_3	OH	CH_3	0,4	n.b.	n.b.
1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-hydroxy-methylxanthon	OH	H	H	CH_3	OH	CH_2OH	< 0,1	n.b.	n.b.
1,3,6-Trihydroxyxanthon (**7a**)	OH	OH	H	OH	H	H	11,0	11,2	6,2
1,3,7-Trihydroxyxanthon (**8a**)	OH	OH	H	H	OH	H	6,1	1,7	2,7
1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon (**9a**)	OH	OH	H	OH	H	OH	11,8	8,4	14,0

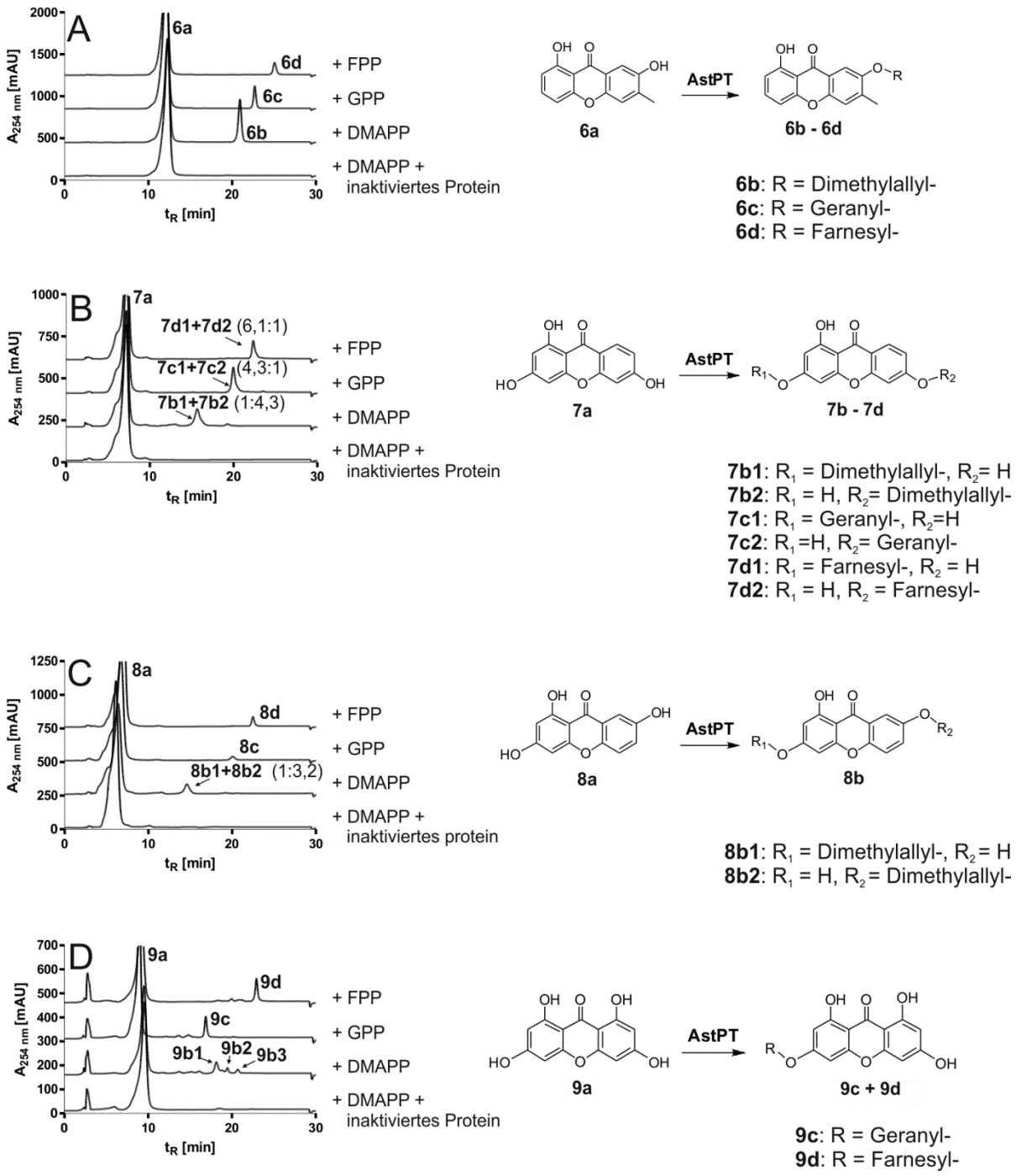


Abbildung 3-8: HPLC-Chromatogramme der Inkubationen von AstPT mit Hydroxyxanthonderivaten 6a-9a und katalysierte Reaktionen (Tarcz *et al.,* 2014b). Inkubationen wurden mit 20 µg AstPT-His_6 für 16 h bei 37 °C durchgeführt und anschließend dreimal mit Ethylacetat extrahiert.

thon (**8a**) jeweils ein zusätzlicher, dominanter Peak zu erkennen, bei der Inkubation von 1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon (**9a**) mit DMAPP sogar drei (Abbildung 3-8). **6a** war das am besten akzeptierte Substrat mit absoluten Umsetzungen von 23,1%, 26,1% bzw. 18,8%. Bemerkenswert dabei war, dass in Anwesenheit von GPP als Prenyldonor eine höhere Umsetzung beobachtet werden konnte als mit DMAPP. Mit AQ D als aromatisches Substrat

hatte sich AstPT als sehr spezifisch für DMAPP als Prenyldonor gezeigt. Die übrigen drei Substrate **7a** – **9a** wurden schlechter akzeptiert mit relativen Umsetzung zwischen 30% und 75% verglichen mit **6a**. Auch in den Inkubationen von **7a** konnten mit GPP (11,2%) leicht höhere Umsetzungen erreicht werden als mit DMAPP (11,0%). **8a** dagegen zeigte mit GPP (1,7%) die schlechteste Umsetzung; hier war DMAPP der am besten akzeptierte Prenyldonor. Für **9a** konnte die höchste Umsetzung wiederum mit FPP (14,0%) erhalten werden.

Wenn einerseits die Bisindolylbenzochinon-PTase AstPT auch Hydroxyxanthone als aromatische Substrate akzeptiert, könnte auch die Xanthon-PTase XptB in der Lage sein, AQ D umzusetzen, oder sogar ihr natürliches Substrat 1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-hydroxy-methylxanthon in Anwesenheit von GPP oder gar FPP zu prenylieren? Wie verhält sich andererseits TdiB in Bezug auf Hydroxyxanthonderivate?

Um dies zu untersuchen, wurde XptB wie bereits beschrieben (Pockrandt *et al.,* 2012) überproduziert und aufgereinigt und schließlich mit AQ D in Anwesenheit von DMAPP, GPP und FPP für 16 h bei 37 °C inkubiert. Inkubationen mit dem natürlichen Substrat dienten dabei als Positivkontrolle. Allerdings konnte mit AQ D keinerlei Umsetzung festgestellt werden (Abbildung 3-9). Während XptB mit 1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-hydroxymethylxanthon und DMAPP wie erwartet eine Umsetzung zeigte, war wiederum mit GPP und FPP keine Produktbildung zu erkennen.

Auch TdiB wurde mit den Hydroxyxanthonen **6a**–**9a** sowie jeweils den Prenyldonoren DMAPP, GPP und FPP für 16 h bei 37 °C inkubiert, doch auch hier konnte keinerlei Produktbildung beobachtet werden.

Die Aktivitätstests von AstPT mit DDAQ D sind unter 3.1.3.4 beschrieben. Neben den bisher beschriebenen AQ D und Hydroxyxanthonen wurde AstPT auch mit anderen aromatischen Substraten hinsichtlich seiner Aktivität getestet, da PTasen der DMATS-Superfamilie häufig ein breites Substratspektrum aufweisen (Yu & Li 2012). Cyclische Dipeptide wurden dabei genauso wenig akzeptiert wie Derivate von aromatischen Aminosäuren oder andere Substanzen (Tabelle 3-5). Lediglich unter Verwendung von Dehydroxyterphenyllin konnte mit 20 µg Protein ein Umsatz von insgesamt 7,1% erreicht werden (Abbildung 3-10).

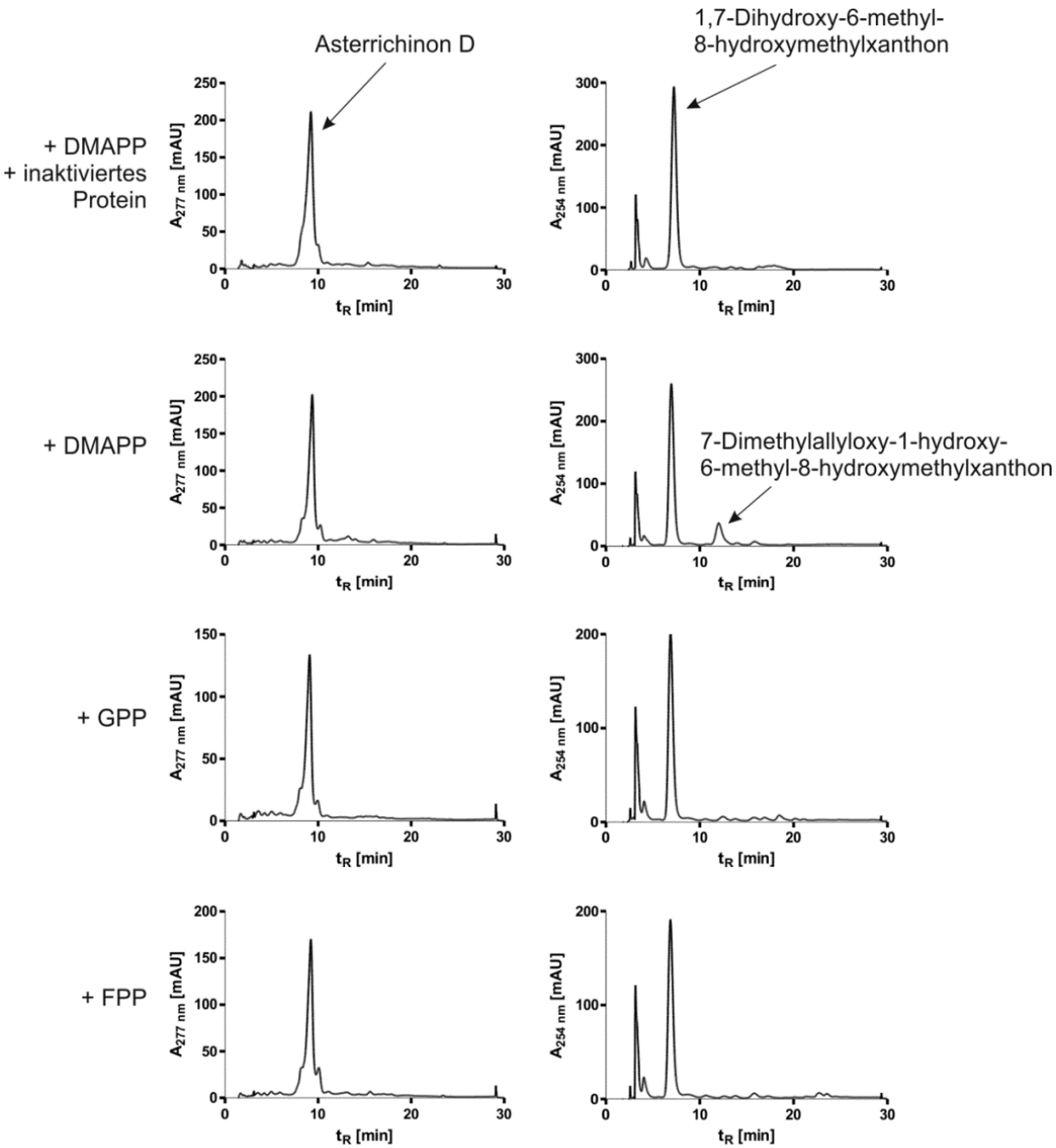


Abbildung 3-9: HPLC-Chromatogramme der Inkubationen von XptB mit AQ D und 1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-hydroxymethylxanthon. Die Inkubation von XptB mit 1,7-Dihydroxy-6-methyl-8-hydroxymethylxanthon in Anwesenheit von DMAPP dient als Positivkontrolle.

Tabelle 3-5: Übersicht über die übrigen, mit AstPT getesteten Substrate.

Aromatische Aminosäuren	L-Tyrosin 3-Aminotyrosin *p*-Amino-D-phenylalanin 3,4-Dihydroxy-L-phenylalanin L-β-Homotryptophan L-Tryptophan N-Acetyl-DL-tryptophan 5-Hydroxy-L-tryptophan 6-Fluoro-DL-Tryptophan	**Benzochinone und Vorstufen**	2,5-Dimethoxy-3,6-bis-(4-methoxyphenyl)-benzochinon 2,5-Dihydroxy-3-indolylbenzochinon 2,5-Dichlor-3-indolylbenzochinon 2,5-Dichlor-3,6-bisindolyl-benzochinon 2-Chlor-5-methoxy-3,6-bisindolyl-benzochinon
Cyclische Peptide	*cyclo*-L-Ala-L-Trp *cyclo*-D-Trp-L-Tyr *cyclo*-Gly-L-Tyr *cyclo*-L-His-L-Pro *cyclo*-L-His-L-Trp *cyclo*-L-Phe-L-Phe *cyclo*-L-Pro-L-Tyr *cyclo*-L-Trp-Gly *cyclo*-L-Trp-L-Leu *cyclo*-L-Trp-L-Phe *cyclo*-L-Trp-L-Pro *cyclo*-L-Trp-L-Trp *cyclo*-L-Trp-L-Tyr *cyclo*-L-Phe-L-Ser *cyclo*-L-Ser-L-Tyr *cyclo*-L-Tyr-L-Tyr *cyclo*-L-Tyr-Ant (*R*)-Benzodiazepindion (*cyclo*-D-Trp-Ant) (*S*)-Benzodiazepindion (*cyclo*-L-Trp-Ant)	**Indolderivate**	Indol-3-essigsäure Tryptamin
		Naphthalin-derivate	1-Naphthol 1,6-Dihydroxynaphthalin 8-Amino-2-naphthol
		Flavonoide	Biochanin A Butein Chrysin Galangin Hesperetin Hesperidin Phloretin Quercitrin
		Benzophenone	1,5,8-Trihydroxybenzophenon Maclurin
		Sonstige Substanzen	2-Amino-2-(4-hydroxyphenyl)-essigsäure 3-(4-hydroxyphenyl)-propansäure 4-Hydroxyphenylbrenztraubensäure 5,8-Dihydroxy-1,4-naphthochinon Cyclopiazonsäure Mimosin Phloroglucid
In Anwesenheit von DMAPP konnte nach Inkubation für 16 h bei 37 °C keine Umsetzung beobachtet werden.			

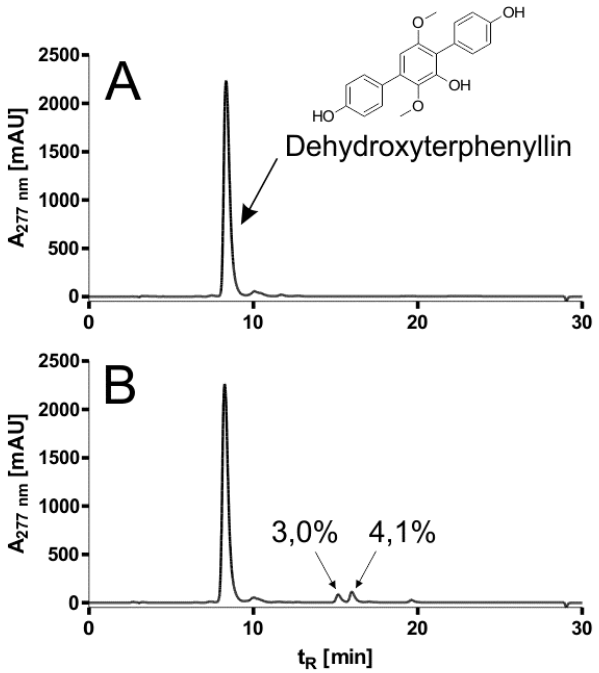


Abbildung 3-10: HPLC-Chromatogramme von Dehydroxyterphenyllin (A) und der Umsetzung durch AstPT (B). Inkubationen wurden für 16 h bei 37 °C mit 20 µg (B) Protein durchgeführt.

3.1.2.5. Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte von AstPT

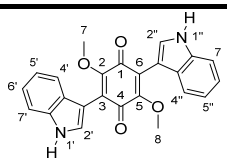
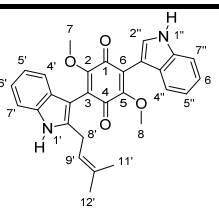
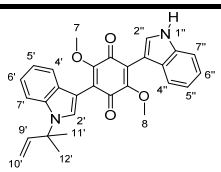
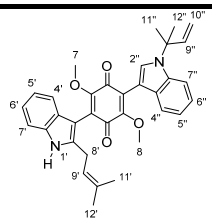
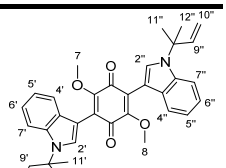
3.1.2.5.1. Enzymatische Produkte aus Inkubationen mit Asterrichinon D

Die Isolierung der enzymatischen Produkte von AstPT mit AQ D wurde mittels HPLC durchgeführt. Dazu wurden je 0,5 mM AQ D in zwei 20 ml-Ansätzen mit je 2 mM DMAPP, 5 mM $CaCl_2$ und 4,8 mg AstPT-His_6 in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) bei 37 °C inkubiert. Ein Ansatz wurde 2 h inkubiert und diente hauptsächlich der Gewinnung der Produkte **2** und **3**, während der zweite Ansatz 16 h inkubiert wurde und **4** und **5** liefern sollte. Nach Inkubation wurden die Ansätze vereinigt und zur gemeinsamen Isolierung der Produkte mittels HPLC aufgetrennt. Die isolierten Produkte wurden anschließend mithilfe der hochaufgelösten Massenspektrometrie untersucht, die erhaltenen Daten sind in Tabelle 3-6 wiedergegeben, die Spekten im Anhang unter 6.1. Während das Edukt AQ D ($C_{24}H_{18}N_2O_4$) eine theoretische relative Molekülmasse von 398,1267 besitzt, konnten für die Produkte **2** und **3** jeweils Massen von 466,1896 bzw. 466,1903 gefunden werden, für die Produkte **4** und **5** von 534,2493 bzw. 534,2540. Die Erhöhung der relativen Molekülmassen um jeweils 68 entspricht dabei der Masse eines Dimethylallylrests. Damit liegt, wie bereits vermutet, bei **2** und **3** eine einfache und bei **4** und **5** eine zweifache Prenylierung vor. Um nun die Position der Prenylierungen zu bestimmen, wurden die Kernresonanzspektren von AQ D und die der Produkte verglichen. Die ^{1}H-NMR-Daten sind in Tabelle 3-7 wiedergegeben, die Spektren sind im Anhang unter 6.1 zu finden. AQ D enthält zwei aromatische Systeme und aufgrund seiner Symmetrie sind die chemischen Verschiebungen der Signale der beiden Systeme identisch, die Signale sind also nur einmal wiederzufinden. Die Signale der aromatischen Protonen konnten im Bereich von 7,69 bis 7,08 ppm wiedergefunden werden. Für H-4‘ bis H-7‘ zusammen mit H-4‘‘ bis H-7‘‘ waren jeweils Kopplungen von 8.1 Hz (*ortho*-Position) und 1.1 Hz (*meta*-Position) zu erkennen. H-2‘ und H-2‘‘ erschienen durch ihre Kopplungspartner an N-1‘ und N-1‘‘ als Dublett mit einer Kopplungskonstante von 2.7 Hz. Das Signal von N-1‘ und N-1‘‘ war bei 10.82 ppm als breites Singulett zu erkennen, das der beiden Methylgruppen bei 3.81 als Singulett.

Tabelle 3-6: Positive HR-EI-MS-Daten der isolierten Produkte von AstPT mit AQ D.

Produkt	Summenformel	$[M]^+$		Abweichung [ppm]
		berechnet	gemessen	
2	$C_{29}H_{26}N_2O_4$	466,1893	466,1896	+ 0,6
3	$C_{29}H_{26}N_2O_4$	466,1893	466,1903	+ 2,2
4	$C_{34}H_{34}N_2O_4$	534,2519	534,2493	- 4,9
5	$C_{34}H_{34}N_2O_4$	534,2519	534,2540	+ 3,9

Tabelle 3-7: ^{1}H-NMR-Daten von AQ D und der enzymatischen Produkte von AstPT.

Substanz	 AQ D (**1**)	 **2**	 **3**	 **4**	 **5**
Proton	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***
7	3.81, s	3.79, s	3.83, s	3.80, s	3.82, s
8	3.81, s	3.72, s	3.81, s	3.72, s	3.82, s
1'	10.82, br s	10.32, br s	-	10.33, br s	-
2'	7.69, d, 2.7	-	7.74, s	-	7.74, s
4'	7.49, dt, 8.1, 1.1	7.31, ddd, 8.0, 1.2, 0.7	7.51, ddd, 8.2, 1.4, 0.7	7.30, ddd, 8.0, 1.2, 0.7	7.50, ddd, 7.9, 1.4, 0.7
5'	7.08, ddd, 8.1, 7.0, 1.1	7.00, ddd, 8.0, 7.1, 1.1	7.09, ddd, 8.2, 6.9, 1.2	7.00, ddd, 8.0, 6.9, 1.2	7.08, ddd, 7.9, 7.0, 1.5
6'	7.16, ddd, 8.1, 7.0, 1.1	7.09, ddd, 8.1, 7.1, 1.2	7.12, ddd, 8.3, 6.9, 1.4	7.08, ddd, 7.9, 6.9, 1.2	7.12, ddd, 8.3, 7.0, 1.4
7'	7.53, ddt, 8.1, 1.1, 0.7	7.49, ddd, 8.1, 1.1, 0.7	7.60, ddd, 8.3, 1.2, 0.7	7.49, ddd, 7.9, 1.2, 0.7	7.60, ddd, 8.3, 1.5, 0.7
8'	-	3.47, m	-	3.46, m	-
9'	-	5.39, t sept, 7.3, 1.4	6.26, dd, 17.5, 10.7	5.39, t sept, 7.3, 1.4	6.26, dd, 17.4, 10.7
10'	-	-	5.28, dd, 10.7, 0.8 5.25, dd, 17.5, 0.8	-	5.28, dd, 10.7, 0.7 5.25, dd, 17.4, 0.7
11'	-	1.70, s	1.86, s	1.70, d, 1.2	1.86, s
12'	-	1.70, s	1.86, s	1.70, d, 1.2	1.86, s
1''	10.82, br s	10.87, br s	10.80, br s	-	-
2''	7.69, d, 2.7	7.68, d, 2.6	7.69, d, 2.7	7.73, s	7.74, s
4''	7.49, dt, 8.1, 1.1	7.35, ddd, 8.1, 1.2, 0.8	7.49, dt, 8.1, 0.9	7.35, ddd, 8.1, 1.2, 0.9	7.50, ddd, 7.9, 1.4, 0.7
5''	7.08, ddd, 8.1, 7.0, 1.1	7.06, ddd, 8.1, 7.0, 1.3	7.08, ddd, 8.1, 7.0, 1.1	7.06, ddd, 8.1, 7.0, 1.1	7.08, ddd, 7.9, 7.0, 1.5
6''	7.16, ddd, 8.1, 7.0, 1.1	7.16, ddd, 8.1, 7.0, 1.2	7.16, ddd, 8.2, 7.0, 1.2	7.12, ddd, 8.3, 7.0, 1.2	7.12, ddd, 8.3, 7.0, 1.4
7''	7.53, ddt, 8.1, 1.1, 0.7	7.52, ddd, 8.1, 1.3, 0.8	7.53, ddt, 8.2, 1.1, 0.9	7.60, ddd, 8.3, 1.1, 0.9	7.60, ddd, 8.3, 1.5, 0.7
8''	-	-	-	-	-
9''	-	-	-	6.26, dd, 17.5, 10.7	6.26, dd, 17.4, 10.7
10''	-	-	-	5.28, dd, 10.7, 0.7 5.25, dd, 17.5, 0.7	5.28, dd, 10.7, 0.7 5.25, dd, 17.4, 0.7
11''	-	-	-	1.86, s,	1.86, s
12''	-	-	-	1.86, s	1.86, s

^{1}H-NMR-Daten in $(CD_3)_2CO$, 500 MHz. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, br s: breites Singulett, d: Dublett, t: Triplett, sept: Septett, m: Multiplett.

Die Daten der Produkte **2** und **4** wiesen eindeutig auf das Vorhandensein eines regulär verknüpften Prenylrests hin, mit Signalen bei 5.39 ppm (t sept, *J* = 7.3, 1,4 Hz; H-9‘), 3.46 bzw. 3.47 (m; H-8‘) und 1.70 ppm (s bzw. d, *J* = 1.2 Hz; H-11‘+H-12‘). In den Spektren der Produkte **3**, **4** und **5** konnten außerdem Signale eines revers verknüpften Prenylrests wieder-gefunden werden, nämlich bei 6.26 ppm (dd, *J* = 17.5 bzw. 17.4, 10.7 Hz; H-9‘), 5.28 ppm (dd, *J* = 10.7, 0.8 bzw. 0.7 Hz; H-10‘), 5.25 ppm (dd, *J* = 17.5 bzw. 17.4, 0.8 Hz bzw 0.7 Hz; H-10‘) und 1.86 ppm (s; H-11‘‘+H-12‘‘). Für alle enzymatischen Produkte waren Signale für vier koppelnde, aromatische Protonen (H4‘ bis H7‘, sowie H4‘‘ bis H7‘‘) zwischen 7.60 und 7.00 ppm zu erkennen, sodass als mögliche Prenylierungspositionen nur noch N1 und C2 in Frage kamen.

Die Produkte **2** und **3** besitzen aufgrund ihrer einfachen Prenylierung eine asymmetrische Struktur, folglich unterscheiden sich die Verschiebungen der Signale der beiden Systeme. Für **2** ließen sich zwei Signale für NH-1‘ (10.32 ppm, br s) und NH-1‘‘(10.87 ppm, br s) wiederfinden, während nur ein Signal für H-2‘‘ (7.68, d, *J* = 2.6 Hz) erschien. Dieses Proton muss, da es als Dublett auftauchte, mit NH-1‘‘ einen Kopplungspartner haben. Ein Signal für H-2‘ fehlte, daher muss die Prenylierung an dieser Position stattgefunden haben. Für **3** war ein NH-1‘‘-Signal (10.80 ppm, br s) zu erkennen, zusammen mit einem H-2‘-Signal als Singulett (7.74 ppm, s) und einem H-2‘‘-Signal als Dublett (7.69 ppm, d, *J* = 2.7 Hz). Das Erscheinen von H-2‘ als Singulett wies dementsprechend auf eine Prenylierung an N-1‘ hin. Die erhaltenen Signale entsprechen zudem denen des bereits beschriebenen AQ B3 (Arai *et al.,* 1981a). Das Spektrum von **4** enthielt Signale von sowohl einem regulären als auch einem reversen Prenylrest. Es war jeweils nur ein Signal für NH-1‘ (10.33 ppm, br s) und H-2‘‘ (7.73 ppm, s) zu finden, was sich durch eine reguläre Prenylierung an C-2‘ sowie eine reverse Prenylierung an N-1‘‘ erklären lässt. Diese Substanz wurde bereits im Rahmen von Zytotoxi-zitätsuntersuchungen synthetisiert und als „6b“ bezeichnet (Kaji *et al.,* 1998b). Die ^{1}H-NMR-Daten von **4** und „6b“ korrelierten gut miteinander. Im Spektrum von **5** war, wie bereits für AQ D, für alle Protonen der beiden aromatischen Systeme nur jeweils ein Signal zu erkennen, das Produkt muss mit seinen zwei Prenylierungen folglich eine symmetrische Struktur aufweisen. Signale für NH-1 konnten nicht gefunden werden, dagegen erschienen H-2‘ und H-2‘‘ als Singulett bei 7.74 ppm. Die Prenylreste müssen demzufolge mit N-1‘ bzw. N-1‘‘ verknüpft sein. Die Daten korrelieren gut mit einem Referenzspektrum von einem Dimethylether von Asterrichinon (Yamamoto *et al.,* 1976b), auch bekannt als AQ A1 (Arai *et al.,* 1981a).

3.1.2.5.2. Enzymatische Produkte aus Inkubationen mit Hydroxyxanthonen

Die Isolierung der enzymatischen Produkte von AstPT mit Hydroxyxanthonen wurde mittels HPLC durchgeführt. Insgesamt konnten neun Peaks isoliert werden, von denen sich vier als Gemische aus jeweils zwei Substanzen herausstellten. HR-EI-MS-Analysen zeigten, dass es sich bei allen enzymatischen Produkten jeweils um einfach prenylierte Substanzen handelte, d.h. die relativen Molekülmassen der Produkte waren um jeweils 68 (**b**-Reihe, DMAPP-Produkte), 136 (**c**-Reihe, GPP-Produkte) oder 204 (**d**-Reihe, FPP-Produkte) erhöht (Tabelle 3-8, 6.2).

Tabelle 3-8: Positive HR-EI-MS-Daten der isolierten Produkte von AstPT mit Hydroxyxanthonen.

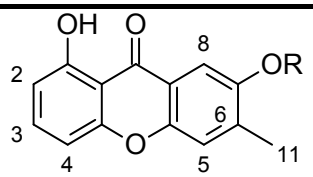
Substanz	Summenformel	$[M]^+$		Abweichung [ppm]
		berechnet	gemessen	
6b	$C_{19}H_{18}O_4$	310,1205	310,1227	7,1
6c	$C_{24}H_{26}O_4$	378,1831	378,1817	-3,7
6d	$C_{29}H_{34}O_4$	446,2487	446,2457	-6,7
7b1 + **7b2**	$C_{18}H_{16}O_5$	312,0998	312,0994	-1,3
7c1 + **7c2**	$C_{23}H_{24}O_5$	380,1624	380,1632	2,1
7d1 + **7d2**	$C_{28}H_{32}O_5$	448,2224	448,2250	5,8
8b1 + **8b2**	$C_{18}H_{16}O_5$	312,0998	312,0979	-6,1
9c	$C_{23}H_{24}O_6$	396,1573	396,1595	5,6
9d	$C_{28}H_{32}O_6$	464,2199	464,2158	-8,8

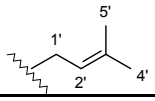
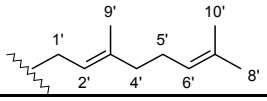
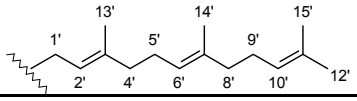
Theoretische Massen der Substrate: **6a** ($C_{14}H_{10}O_4$): 242,0580, **7a** ($C_{13}H_8O_5$): 244,0372, **8a** ($C_{13}H_8O_5$): 244,0372, **9a** ($C_{13}H_8O_6$): 260,0321.

Die Auswertung der ^{1}H-NMR-Daten zeigte, dass für sämtliche Produkte die Signale der aromatischen Protonen wiederzufinden waren, die Prenylierungen müssen folglich an den Hydroxylgruppen stattgefunden haben. Dafür sprach auch das Erscheinen von H-1‘ des Prenylrests jeweils im Bereich zwischen 4.69 bis 4.79 ppm, was typisch für eine *O*-Prenylierung ist (Zou *et al.,* 2011). Die ^{1}H-NMR-Daten sind in Tabelle 3-9 bis Tabelle 3-12 aufgelistet, die Spektren im Anhang unter 6.2. Die Signale für H-2‘ waren zwischen 5.35 und 5.54 ppm als Tripletts wiederzufinden. Die Signale der Methylgruppen der Prenylreste (H-4‘ und H-5‘ im Dimethylallyl-, H-8‘, H-9‘ und H-10‘ im Geranyl- und H-12‘, H-13‘, H-14‘ und H-15‘ im Farnesylrest) erschienen zwischen 1.55 und 1.86 ppm. Die Signale der zusätzlichen olefinischen Protonen (H-6‘ im Geranyl- und H-6‘ und H-10‘ im Farnesylrest) waren als Tripletts zwischen 5.03 und 5.54 ppm wiederzufinden, was wiederum dafür sprach, dass die Prenylierungen *O*-verknüpft, aber nicht weiter modifiziert waren, z.B. durch Ringschlüsse oder Ähnliches.

Ein Vergleich der Produkte **6b**–**6d** zeigte, dass die chemischen Verschiebungen sowie die Kopplungskonstanten der aromatischen Protonen nahezu identisch waren, was für eine Prenylierung an derselben Stelle in den Produkten sprach. Verglichen mit dem Substrat **6a** wurde das H-5 der Produkte am stärksten tieffeldverschoben (+0.06 ppm), was vermutlich eher durch eine Prenylierung an OH-7 statt an OH-1 verursacht wurde. Um dies zu bestätigen, wurde ein ^{1}H-^{13}C-HMBC-Spektrum von **6d** aufgenommen (Abbildung 6-18). Dort konnten eindeutig Korrelationen zwischen H-1‘ des Farnesylrestes und C-7 nachgewiesen werden, was die Verknüpfung des Farnesylrestes an OH-7 beweist (Abbildung 3-11). Bei **6d** handelt es sich folglich um 1-Hydroxy-7-farnesyloxy-6-methylxanthon. Die Positionen der Prenylierungen in **6b** und **6c** wurden analog zugewiesen, da dieselben Unterschiede in den chemischen Verschiebungen wiedergefunden werden konnten wie für **6d**. Die Produkte wurden als 1-Hydroxy-7-dimethylallyloxy-6-methylxanthon (**6b**) und 1-Hydroxy-7-geranyloxy-6-methyl-xanthon (**6c**) zugeordnet.

Tabelle 3-9: ^{1}H-NMR-Daten von 6a und den enzymatischen Produkten 6b-6d.



Substanz	**6a:** R= H	**6b:** R= 	**6c:** R= 	**6d:** R= 
Proton	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***
OH-1	12.83, s	12.82, s	12.82, s	12.82, s
2	6.74, dd, 8.3, 0.9	6.77, dd, 8.3, 0.9	6.77, dd, 8.3, 0.8	6.77, dd, 8.3, 0.9
3	7.67, t, 8.3	7.69, t, 8.3	7.69, t, 8.3	7.69, t, 8.3
4	6.98, dd, 8.3, 0.9	7.01, dd, 8.3, 0.9	7.01, dd, 8.3, 0.8	7.01, dd, 8.3, 0.9
5	7.40, q, 0.9	7.46, q, 0.8	7.46, br s	7.46, br s
OH-7	12.83, s	-	-	-
8	7.58, s	7.57, s	7.57, s	7.56, s
11	2.37 , d, 0.9	2.39, d, 0.8	2.39, s	2.39, d, 0.8
1´	-	4.75, d, 6.6	4.78, d, 6.7	4.79, d, 6.5
2´	-	5.54, t, 6.6	5.54, td, 6.5, 1.2	5.53, td, 6.4, 1.2
4´	-	1.83, br s[a]	2.14, m	2.15, m
5´	-	1.81, br s[a]	2.14, m	2.15, m
6´	-	-	5.11, t, 6.6	5.13, t, 6.6
8´	-	-	1.62, br s[b]	2.02, m
9´	-	-	1.85, s	2.02, m
10´	-	-	1.59, s[b]	5.03, t, 7.0
12´	-	-	-	1.62, br s[c]
13´	-	-	-	1.86, s
14´	-	-	-	1.60, s
15´	-	-	-	1.55, s[c]

^{1}H-NMR-Daten in $(CD_3)_2CO$, 500 MHz. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, br s: breites Singulett, d: Dublett, t: Triplett, q: Quartett, m: Multiplett. [a-c]: Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Signale sind austauschbar.

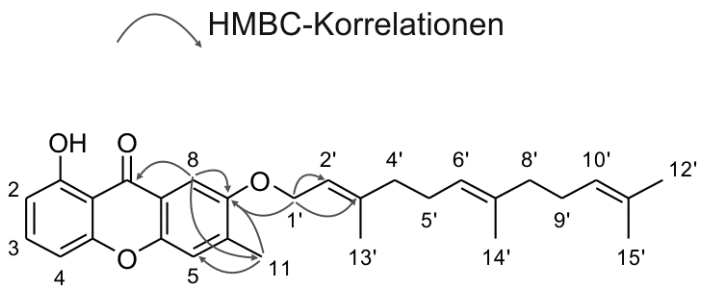
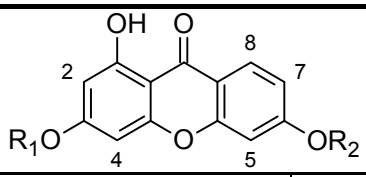
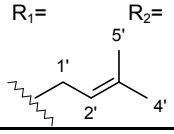
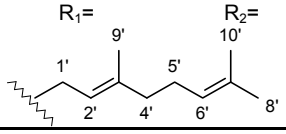
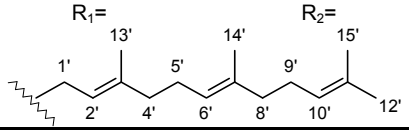


Abbildung 3-11: Relevante ^{1}H/^{13}C-Korrelationen im HMBC-Spektrum von 6d.

Die ^{1}H-NMR-Daten der isolierten Peaks **7b**-**7d** zeigte, dass es sich jeweils um Gemisch aus zwei Substanzen handelte. Aus der Inkubation von **7a** mit DMAPP konnten **7b1** und **7b2** (Verhältnis 1:4,3) gewonnen werden, mit GPP **7c1** und **7c2** (4,3:1) und mit FPP **7d1** und **7d2** (6,1:1). Die Substanzen konnten mittels HPLC leider nicht weiter aufgetrennt werden, sodass die ^{1}H-NMR-Daten aus den Spektren der Gemische zugeordnet wurden.

Tabelle 3-10: ^{1}H-NMR-Daten von 7a und den enzymatischen Produkten 7b1-7d2.



Substanz	**7a** R_1= R_2= H	**7b1** R_2=H R_1= 	**7b2** R_1=H R_2=	**7c1** R_2=H R_1= 	**7c2** R_1=H R_2=	**7d1** R_2=H R_1= 	**7d2** R_1=H R_2=
Proton	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***
OH-1	13.12, s	-	13.06, s	13.03, s	-	13.05, s	-
2	6.23, d, 2.2	6.29, d, 2.3	6.24, d, 2.1	6,10, d, 2,0	6.21, d, 2.2	6.19, d, 2.1	6.25, d, 2.3
OH-3	13.12, s	-	13.06, s	-	-	-	-
4	6.39, d, 2.2	6.49, d, 2.3	6.41, d, 2.1	6.25, d, 2.0	6.42, d, 2.2	6.35, d, 2.1	6.45, d, 2.3
5	6.88, d, 2.3	6.87, d, 2.2	7.01, s	6.94, s	6.60, d [d]	6.97, d, 2.3	6.76, d, 2.1
OH-6	13.12, s	-	-	13.03, s	-	13,05, s	-
7	6.96, dd, 8.7, 2.3	6.95, dd, 8.8, 2.2	7.01, dd, 8.6, 2.4	6.93, dd, 7.9, 2.0	6.74, dd [d]	6.97, dd, 9.5, 2.3	6.87, dd, 8.6, 2.1
8	8.05, d, 8.7	8.03, d, 8.8	8.07, dd, 8.6, 0.5	8.02, m	7.90, d, 8.7	8.05, d	7.98, d, 9.1
1´	-	4.70, d, 6.5	4.76, d, 6.7	4.76, d, 6.5	4.69, d, 6.8	4.78, d, 6.3	4.72, d, 6.1
2´	-	5.50, t, 6.5	5.53, t, 6.7	5.52, t, 6.5	- [e]	5.53, t, 6.3	- [f]
4´	-	1.78, s	1.80, s	2.14, m	- [e]	2.14, m	- [f]
5´	-	1.78, s	1.80, s	2.14, m	- [e]	2.14, m	- [f]
6´	-	-	-	5.11, t, 6.9	- [e]	5.13, t, 6.8	- [f]
8´	-	-	-	1.63, br s [a]	1.57, s [b]	1.94, m	- [f]
9´	-	-	-	1.80, br s	1.79, s	1.94, m	- [f]
10´	-	-	-	1.59, br s [a]	1.56, s [b]	5.05, t, 7.0	- [f]
12´	-	-	-	-	-	1.63, br s [c]	1.65, s
13´	-	-	-	-	-	1.81, br s	1.80, d, 1.2
14´	-	-	-	-	-	1.60, br s	1.59, s
15´	-	-	-	-	-	1.56, br s [c]	1.56,s [f]

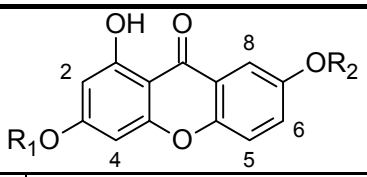
^{1}H-NMR-Daten in $(CD_3)_2CO$, 500 MHz. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungs-konstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, br s: breites Singulett, d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett. [a-c]: Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Signale sind austauschbar. [e]: Signale überlappen mit denen von **7c1**. [f]: Signale überlappen mit denen von **7d1**.

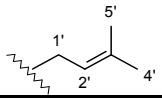
Im Vergleich mit den entsprechenden Signalen in **7a** haben sich die chemischen Verschiebungen von H-7 und H-8 in **7b1**, **7c1** und **7d1** kaum verändert, was eine Prenylierung an OH-6 eher unwahrscheinlich macht. Dagegen konnten für H-2, H-4 und H-5 größere Abweichungen gefunden werden, was für eine Prenylierung an OH-3 spricht. Die Positionen der Prenylierungen für **7b1**, **7c1** und **7d1** wurden also OH-3 zugeordnet. Für **7b2**, **7c2** und **7d2** unterschieden sich die Verschiebungen von H-5 und H-7 am deutlichsten von denen von **7a**, während die von H-2 kaum verändert waren. Die Positionen der Prenylierungen wurden für **7b2**, **7c2** und **7d2** also jeweils OH-6 zugeordnet.

Mit **8a** als aromatisches Substrat konnte ein auswertbares Spektrum nur mit den Produkten **8b1** und **8b2** (1:3,2) aus der Inkubation mit DMAPP erhalten werden. Verglichen mit den Daten von **8a**, konnten für **8b1** die stärksten Veränderungen der chemischen Verschiebungen für H-2 und H-4 gefunden werden, während H-5, H-6 und H-8 kaum

verändert waren. Dagegen waren für **8b2** H-5 und H-6 am stärksten von Veränderungen betroffen. Daher wurden die Positionen der Dimethylallylreste in **8b1** OH-3 und in **8b2** OH-7 zugeordnet.

Tabelle 3-11: ^{1}H-NMR-Daten von 8a und den enzymatischen Produkten 8b1 und 8b2.

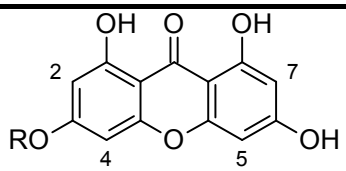


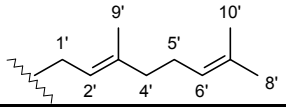
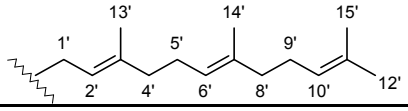
Substanz	**8a** R_1=R_2=H	**8b1** R_2=H R_1= 	**8b2** R_1=H R_2=
Proton	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***
OH-1	12.99, s	-	12.96, s
2	6.25, d, 2.1	6.33, d, 2.3	6.28, d, 2.1
OH-3	12.99, s	-	12.96, s
4	6.41, d, 2.1	6.53, d, 2.3	6.45, d, 2.1
5	7.45, d, 9.0	7.47, dd, 9.1, 0.4	7.50, dd, 9.1, 0.4
6	7.36, dd, 9.0, 3.0	7.38, dd, 9.1, 3.0	7.42, dd, 9.1, 3.1
OH-7	12.99 s	-	-
8	7.57, d, 3.0	7.58, d, 3.0	7.60, d, 3.1
1´	-	4.72, d, 6.9	4.70, d, 6.6
2´	-	5.35, t, 5.2	5.50, t, 6.6
4´	-	1.81 [a]	1.81, s [a]
5´	-	1.79 [a]	1.79, s [a]

^{1}H-NMR-Daten in $(CD_3)_2CO$, 500 MHz. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett. [a]: Signale sind austauschbar.

Aufgrund der symmetrischen Struktur waren im ^{1}H-NMR-Spektrum von **9a** lediglich zwei Signale von jeweils zwei miteinander koppelnden Protonen zu finden. Auswertbare Spektren konnten für die Produkte aus der Inkubation mit GPP (**9c**) und FPP (**9d**) erhalten werden, in denen jeweils zwei verschiedene Kopplungssysteme zu erkennen waren. Die größten Veränderungen der chemischen Verschiebungen wurden hier für H-2 gefunden, sodass die Position der Prenylierungen jeweils OH-3 zugeordnet wurde.

Tabelle 3-12: ^{1}H-NMR-Daten von 9a und den enzymatischen Produkten 9c und 9d.



Substanz	9a R = H	9c R= 	9d R= 
Proton	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***
OH-1	11.99, s	-	12.16, s
2	6.25, d, 2.2	6.33, d, 2.3 [a]	6.28, d, 2.3 [d]
OH-3	11.99, s	-	-
4	6.38, d, 2.2	6.51, d, 2.3 [b]	6.46, d, 2.3 [e]
5	6.38, d, 2.2	6.41, d, 2.1 [b]	6.32, d, 1.9 [e]
OH-6	11.99, s	-	11.91, s
7	6.25, d, 2.2	6.26, d, 2.1 [a]	6.18, d, 1.9 [d]
OH-8	11.99, s	-	12.16, s
1‘	-	4.75, d, 6.6	4.74, d, 6.6
2‘	-	5.50, td, 6.6, 1.4	5.49, td, 6.6, 1.3
4‘	-	2.13, m	2.15, m
5‘	-	2.13, m	2.15, m
6‘	-	5.12, t, 6.9	5.13, t, 7.0
8‘	-	1.64, br s [c]	2.05, m
9‘	-	1.80, br s	2.05, m
10‘	-	1.60, br s [c]	5.06, t, 7.1
12‘	-	-	1.61, br s [f]
13‘	-	-	1.80, br s
14‘	-	-	1.63, br s
15‘	-	-	1.56, br s [f]

^{1}H-NMR-Daten in $(CD_3)_2CO$, 500 MHz. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, br s: breites Singulett, d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett. [a-f]: Mit gleichen Buchstaben gekennzeichnete Signale sind austauschbar.

3.1.2.6 Biochemische Charakterisierungen von AstPT

Die meisten bisher charakterisierten Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie katalysieren den Prenyltransfer in Abwesenheit von jeglichen Ionen. Auch ein Zusatz von Chelatbildern wie EDTA führt in der Regel nicht zu einer verminderten Aktivität (Abbildung 3-12). Allerdings konnte häufig gezeigt werden, dass die Zugabe von zweiwertigen Kationen wie Ca^{2+} oder Mg^{2+} die Aktivität der Proteine erhöht (Li 2009; Yu & Li 2012). Die Ionenabhängigkeit von AstPT wurde in Anwesenheit von 0,5 mM AQ D und 2 mM DMAPP mit 5 mM des jeweiligen Ions untersucht. Inkubationen mit EDTA und ohne weitere Zusätze dienten als Kontrollen. Hier zeigte sich, dass AstPT auch in Anwesenheit von EDTA aktiv war. Ein Zusatz von 5 mM Ca^{2+} erhöhte den relativen Umsatz leicht auf 107%, Mg^{2+} auf 102%. Andere zweiwertige Kationen wie Co^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} oder Zn^{2+} hemmten offensichtlich die Aktivität; dieser Effekt war bei Zn^{2+}-Zusatz (Minderung des Umsatzes auf 24%) am stärksten ausgeprägt.

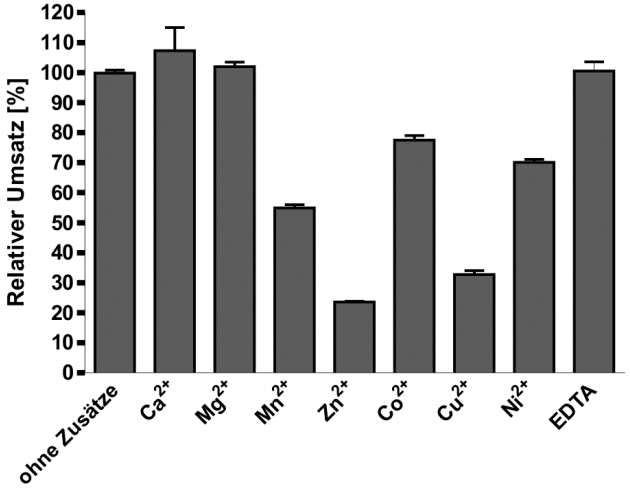


Abbildung 3-12: Relativer Umsatz von AQ D durch AstPT in Anwesenheit von Zusätzen (5 mM). Die Reaktionsansätze wurden mit 0,5 mM AQ D und 2 mM DMAPP für 16 h bei 37 °C durchgeführt. Fehlerbalken kennzeichnen die Abweichungen aus zwei Bestimmungen. Der relative Umsatz aus der Inkubation ohne Zusätze wurde als Referenz (100%) verwendet.

Um die Affinität von AstPT zu seinen Substraten zu untersuchen, wurden kinetische Parameter wie die Michaelis-Konstante (K_M) als Mittelwerte aus den Auftragungen nach Eadie-Hofstee, Hanes-Woolf und Lineweaver-Burk bestimmt. Daraus wurden die Wechselzahl (k_{cat}) und die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) berechnet. Die bestimmten Werte sind in Tabelle 3-13 aufgelistet, die Kurven, die zur Berechnung herangezogen wurden, sind im unter 6.3 abgebildet. Es zeigte sich, dass die von AstPT katalysierte Reaktion die Michaelis-Menten-Kinetik befolgte. Für AQ D (**1**) konnte ein K_M-Wert von 463 µM und eine Wechselzahl von 0,16 s^{-1} bestimmt werden. Allerdings lag dieser Wert bereits am Rand der gemessenen Konzentrationen, höhere Konzentrationen konnten aufgrund der schlechten Löslichkeit von AQ D nicht vermessen werden. Für DMAPP konnte unter Verwendung von AQ D als aromatisches Substrat ein K_M-Wert von 33,5 mM und eine Wechselzahl von 0,02 s^{-1} bestimmt werden.

Unter Verwendung von den Hydroxyxanthonen **6a**–**9a** als aromatische Substrate konnten insgesamt niedrigere K_M-Werte als für AQ D erhalten werden, allerdings war die Wechselzahl für AQ D mindestens um das 160-fache höher, für DMAPP unter Verwendung von AQ D um das 20-fache höher. 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (**6a**) war das am besten akzeptierte Xanthonderivat mit einem K_M-Wert von 17,3 µM. Obwohl GPP in Anwesenheit von AQ D nicht akzeptiert wurde, stellte es sich in Verbindung mit Hydroxyxanthonen mit einem K_M-Wert von 12,1 µM als der am besten akzeptierte Prenyldonor heraus. Aufgrund einer Inhibition bei steigenden Substratkonzentrationen konnten für 1,3,6-Trihydroxyxanthon (**7a**) und FPP keine kinetischen Parameter bestimmt werden.

Tabelle 3-13: Akzeptierte Substrate und kinetische Parameter von AstPT.

Substrat	K_M [µM]	k_{cat} [s^{-1}]	k_{cat}/K_M [$s^{-1}M^{-1}$]
AQ D (**1**)	463	0,16	345,6
DMAPP	33,5	0,02	597,0
6a[a]	17,3	0,001	55,2
7a[a]	-[c]	-[c]	-[c]
8a[a]	168	0,0007	4,2
9a[a]	28,6	0,0003	8,6
DMAPP[b]	97,3	0,001	8,5
GPP[b]	12,1	0,002	169,6
FPP[b]	-[c]	-[c]	-[c]

[a]: Kinetische Parameter für Hydroxyxanthone wurden mit DMAPP als Prenyldonor bestimmt.
[b]: Kinetische Parameter für Prenyldonoren wurden mit **6a** als aromatisches Substrat bestimmt.
[c]: Kinetische Parameter wurden nicht bestimmt, da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit nicht erreicht werden konnte, bevor eine Inhibition einsetzte.

3.1.2.7 Vergleich der aktiven Zentren von ausgewählten Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie

Viele PTasen der DMATS-Superfamilie setzen ähnliche aromatische Substanzen um und besitzen, soweit bekannt, eine gemeinsame Sekundärstruktur (*PT barrel*). Dagegen weisen sie allerdings recht häufig niedrige Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene um 30% auf (Tabelle 3-14). Beispielsweise zählen L-Tryptophan oder L-tryptophanhaltige cyclische Dipeptide zu den häufigsten Substraten; die entsprechenden PTasen sind oftmals durch eine hohe Promiskuität hinsichtlich der aromatischen Substrate charakterisiert (Steffan *et al.,* 2007; Yin *et al.,* 2007; Yin *et al.,* 2010; Yu & Li 2012). Andererseits sind die Enzyme fast gänzlich auf DMAPP als Prenyldonor beschränkt (vgl. 1.2.4.1.2). Um nun Aufschluss über konservierte Aminosäuren in AstPT zu erhalten, wurden verschiedene, bereits charakterisierte PTasen ausgewählt und deren Sequenzen mit der von AstPT verglichen (s. Anhang 6.4). Dabei wurden Enzyme ausgewählt, deren Kristallstrukturen bekannt waren, wie FgaPT2, FtmPT1, CdpNPT und AnaPT und zusätzlich 7-DMATS, sowie aufgrund der vergleichbaren Substrate TdiB und XptB. Dabei zeigte sich, dass nur 19 Aminosäuren in allen Sequenzen konserviert sind. Aufgrund der niedrigen Sequenzhomologie ist es bisher

Tabelle 3-14: Sequenzidentitäten auf Aminosäureebene von AstPT und Homologen.

Enzym	TdiB	AstPT	XptB	FgaPT2	FtmPT1	7-DMATS	AnaPT	CdpNPT
CdpNPT	25	24	24	31	28	25	32	100
AnaPT	26	23	26	31	30	30	100	
7-DMATS	23	26	27	31	26	100		
FtmPT1	20	23	26	36	100			
FgaPT2	26	25	27	100				
XptB	25	23	100					
AstPT	45	100						
TdiB	100							

Sequenzidentitäten sind in Prozent angegeben. TdiB (ABU51603.1) und XptB (BN001302.1) sind aus *A. nidulans*, AstPT (EAU29429.1) aus *A. terreus*, FgaPT2 (AAX08549.1), FtmPT1 (AAX56314.1), 7-DMATS (ABS89001.1) und CdpNPT (ABR14712.1) sind aus *A. fumigatus*, AnaPT (EAW16181.1) ist aus *N. fischeri*.

nicht möglich, aus der Aminosäuresequenz Vorhersagen über das aromatische Substrat oder die Prenylierungsposition zu treffen. Unter den hochkonservierten Aminosäuren befinden sich einige Tyrosine, deren Beteiligung an der Stabilisierung von DMAPP durch Kristallstrukturanalysen aufgezeigt werden konnte (Jost *et al.,* 2010; Metzger *et al.,* 2009; Schuller *et al.,* 2012; Yu *et al.,* 2013). Analoge Reste in AstPT sind Y252, Y338, Y402 und Y406. Durch zielgerichtete Mutageneseexperimente konnten zwei konservierte Lysinreste identifiziert werden, entsprechend K180 und K250 in AstPT, die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Bindung von DMAPP spielen (Stec *et al.,* 2008). Daneben konnte auch für zwei konservierte Argininreste eine Beteiligung an der Bindung von DMAPP gezeigt werden (Jost *et al.,* 2010; Stec *et al.,* 2008). In der Sequenz von AstPT sind mit R95 und R248 analoge Reste wiederzufinden.

Die Stabilisierung des Indolstickstoffs wurde in den bisherigen Kristallstrukturen durch einen konservierten Glutamatrest erreicht, d.h. E89 in FgaPT2 (Metzger *et al.,* 2009), E102 in FtmPT1 (Jost *et al.,* 2010), E116 in CdpNPT (Schuller *et al.,* 2012) und E111 in AnaPT (Yu *et al.,* 2013). In TdiB ist dieser Rest durch ein Aspartat (R67) ersetzt, der allerdings die Funktion des Glutamats übernehmen kann. In AstPT befindet sich an dieser Position allerdings ein Asparagin (N81); eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit eine Stabilisierung des Indolstickstoffs wären aber dennoch möglich.

3.1.3. Klonierung und Charakterisierungsversuche von EAU39348 aus *Aspergillus terreus*

3.1.3.1. Amplifikation von *ATEG_00702* aus gDNA von *A. terreus* A1156

Zur Amplifikation der codierenden Sequenz von EAU39348 sollte dieselbe Strategie genutzt werden, die bereits für *astPT* erfolgreich war. Allerdings konnte unter Verwendung von gDNA von *A. terreus* DSM 1958 kein PCR-Produkt erhalten werden. Nachdem *A. terreus* A1156 verfügbar war, der dem sequenzierten Stamm *A. terreus* NIH 2624 entspricht, wurde versucht die Sequenz aus dessen gDNA zu amplifizieren. Dies war aufgrund des hohen GC-Anteils (68%) erst nach Zusatz von 5% DMSO möglich. Daraufhin wurden die drei Exons getrennt amplifiziert, mit den Primerpaaren ATEG00702_1_pHIS und ATEG_00702_2 für Exon 1, ATEG_00702_3 und ATEG_00702_4 für Exon 2 und ATEG_00702_5 und ATEG00702_6_pHIS für Exon 3. ATEG00702_1_pHIS und ATEG00702_6_pHIS führten eine BamHI- bzw. eine NotI-Schnittstelle ein, die zur späteren Klonierung verwendet werden sollten. Wie im Abschnitt C von Abbildung 3-13 zu sehen ist, konnte die 1287 bp große codierende Sequenz erfolgreich amplifiziert werden.

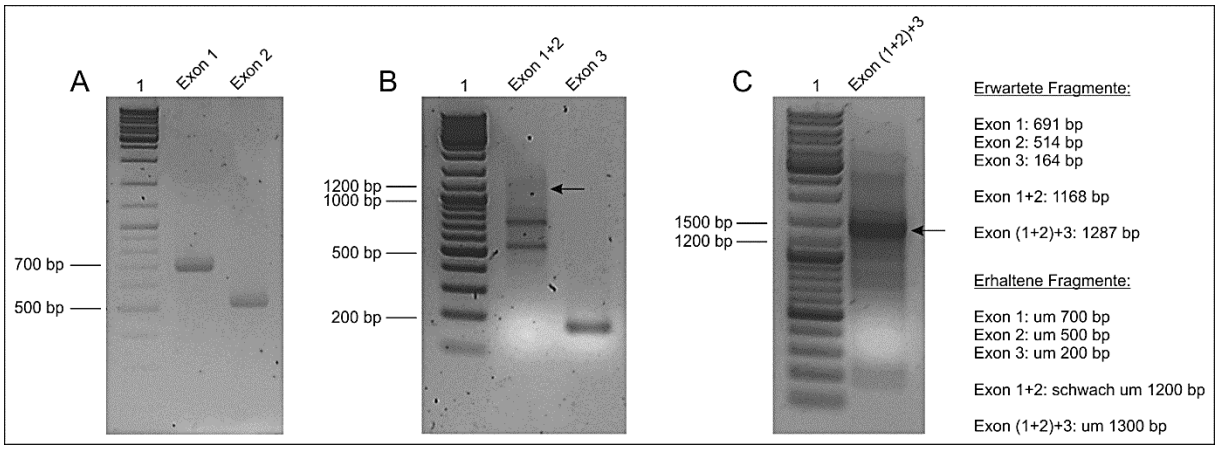


Abbildung 3-13: Agarosegele der PCR-Amplifikationen von *ATEG_00702* aus gDNA von *A. terreus* A1156. A: 2%iges Agarosegel, Amplifikation der Exons 1 und 2. B: 2%iges Agrosegel, Fusion der Exons 1 und 2 und Amplifikation des Exons 3. C: 0,8%iges Agrosegel, Fusion der Exons (1+2) mit Exon 3. Spur 1: jeweils DNA-Größenstandard.

3.1.3.2. Klonierung und Transformation

Die amplifizierte Sequenz von *ATEG_00702* wurde in den Klonierungsvektor pGEM®-T easy ligiert und zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF‘ mittels Hitzeschock verwendet. Durch Blau-Weiß-Selektion wurden negative Kolonien bereits aussortiert und mögliche positive Kolonien zur weiteren Untersuchung kultiviert. Die Plasmide wurden isoliert und einem EcoRI-Verdau unterzogen (Abbildung 3-14). pST35 zeigte das erwartete Restriktionsmuster und die korrekte Sequenz von *ATEG_00702* konnte durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

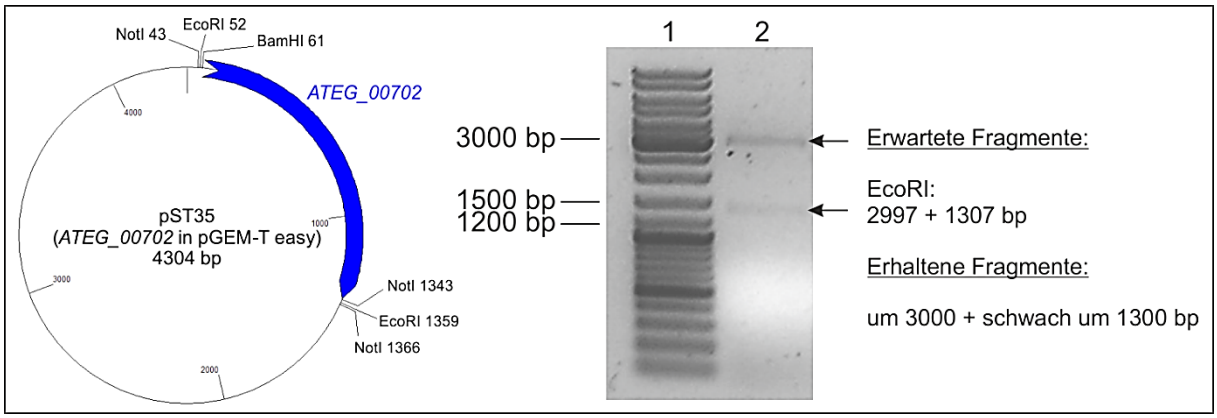


Abbildung 3-14: Vektorkarte von pST35 (*ATEG_00702* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. EcoRI diente der Restriktionskontrolle, BamHI und NotI wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: EcoRI-verdautes pST35.

pST35 und der Expressionsvektor pHIS8 wurden daraufhin einem Doppelverdau mit BamHI und NotI unterzogen. Die erhaltenen Fragmente, 1282 bp für *ATEG_00702* und 5301 bp für pHIS8, wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt, aufgereinigt und miteinander ligiert. Nach Transformation und Isolierung der Plasmide zeigte pST37 das erwartete Restriktionsmuster (Abbildung 3-15). Auch konnte die korrekte Sequenz durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

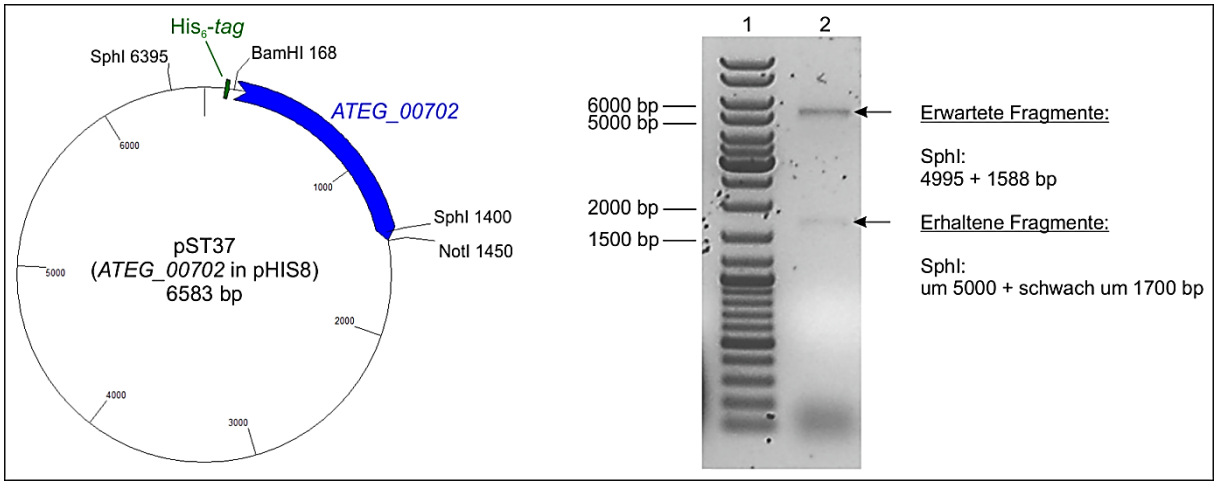


Abbildung 3-15: Vektorkarte von pST37 (*ATEG_00702* in pHIS8) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. BamHI und NotI wurden zur Umklonierung verwendet, SphI diente der Restriktionskontrolle. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: SphI-verdautes pST37.

3.1.3.3. Überproduktion und Reinigung von His_8-EAU39348

Die Überproduktion von EAU39348 wurde mit pST37 (*ATEG_00702* in pHIS8) in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS durchgeführt. Die Zellen wurden in LB-Medium bis zu einer OD_{600} von 0,6 angezogen, aus 22 °C heruntergekühlt und mit 0,1 mM IPTG induziert. Nach 16 h Expression bei 22 °C wurde das Protein mittels Ni-NTA-Agarose aufgereinigt. Wie in Abbildung 3-16 (A) ersichtlich, wurde ein Großteil des Proteins unlöslich exprimiert. Die theoretische Größe des Fusionsproteins betrug 49,4 kDa. Da die Ausbeute allerdings gering war und die Fraktion recht viel Fremdprotein enthielt, wurde ein zweiter Reinigungsschritt über Cobaltharz durchgeführt. Hier konnte eine saubere Proteinfraktion mit einer Ausbeute von 0,1 mg je Liter Kultur erhalten werden (Abbildung 3-16, B).

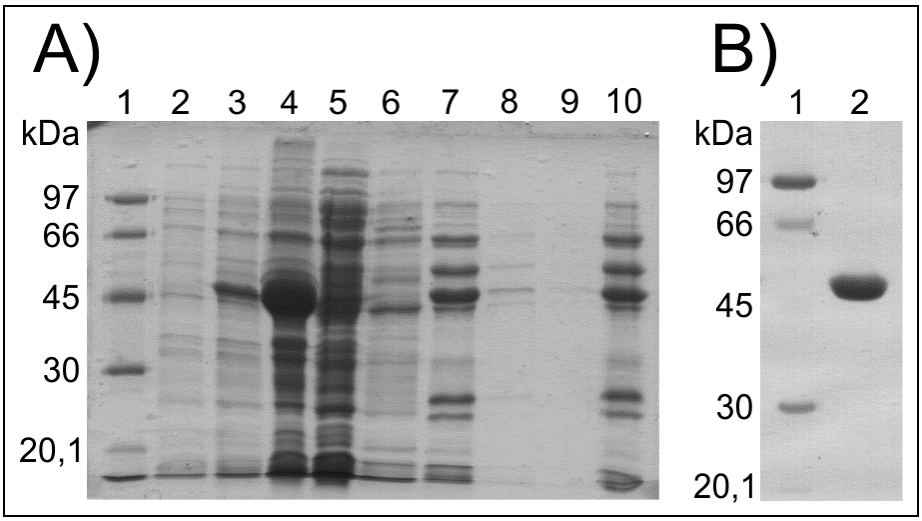


Abbildung 3-16: SDS-PAGE der Aufreinigung von His_8–EAU39348 aus *E. coli* BL21(DE3) pLysS (pST37). A) SDS-PAGE nach Ni-NTA-Reinigung: Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion. Spur 3: Gesamtprotein nach 16 h Inkuktion. Spur 4: unlösliches Protein. Spur 5: Durchflussfraktion. Spur 6: erste Waschfraktion. Spur 7: erste Ni-NTA-Elutionsfraktion. Spur 8: zweite Ni-NTA-Elutionsfraktion. Spur 9: dritte Ni-NTA-Elutionsfraktion. Spur 10: erste Ni-NTA-Elutionsfraktion nach Pufferwechsel. B) SDS-PAGE nach Cobalt-Reinigung: Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: erste Elutionsfraktion nach Cobalt-Reinigung.

3.1.3.4. Aktivitätstests mit EAU39348

Als Homologes von TdiB mit einer Identität von 48% auf Aminosäureebene, das außerdem in einem fast vollständigem *tdi*-homologen Cluster vorliegt, wurde vermutet, dass es sich bei DDAQ D um das natürliche Substrat handeln könnte. Dieses konnte inzwischen in geringen Mengen synthetisiert werden. 6,3 µg des überproduzierten und aufgereinigten Proteins wurden mit 0,5 mM DDAQ D in Anwesenheit von 2 mM DMAPP und 5 mM $CaCl_2$ in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) für 6 h bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch dreimaliges Extrahieren mit Ethylacetat abgestoppt (Schneider *et al.,* 2008b). Reaktionen mit TdiB und AstPT dienten als Vergleiche, da TdiB in der Lage ist, auch ohne zusätzliche Enzyme, DDAQ D zu einem einfach C2-revers prenylierten Produkt umzusetzen (Schneider *et al.,* 2008b). Nach Inkubation und Extraktion war im HPLC-Chromatogramm der TdiB-Inkubation ein zusätzlicher Peak mit einer Retentionszeit um 9,0 min (14%) zu erkennen (Abbildung 3-17, B). Mit AstPT konnte ebenfalls ein Peak um 8,6 min (35%) erhalten werden; außerdem war ein zweiter zusätzlicher Peak um 14,0 min (7%) zu erkennen, jedoch deutlich schwächer (Abbildung 3-17, C). Die Inkubation von DDAQ D mit His_8-EAU39348 (nach Nickel- und Cobalt-Affinitätschromatographie, Abbildung 3-16, B) führte zu drei zusätzlichen Peaks mit Retentionszeiten von 9,4 min (30%), 10,5 min (39%) und 14,4 min (15%) (Abbildung 3-17, D). Zusätzlich wurde eine Inkubation mit einer unsauberen Proteinfraktion nach einfacher Nickel-Affinitätschromatographie (Abbildung 3-16, A) durchgeführt, um zu überprüfen, ob sich die längere, zweistufige Aufreinigung negativ auf die Aktivität von EAU39348 auswirkt. Hier waren mit Retentionszeiten von 10,7 min (28%) und 14,3 min (13%) dieselben Peaks wiederzufinden wie nach Inkubation mit sauberem Protein. Der Peak um 9,4 min war

allerdings geringer ausgeprägt. Aufgrund der geringen verfügbaren DDAQ D-Menge waren weitere Untersuchungen und eine Strukturaufklärung bisher nicht möglich.

Entpsrechende Inkubationen mit AQ D als aromatisches Substrat und den Prenyldonoren DMAPP, GPP und FPP führten nicht zu einer sichtbaren Umsetzung durch EAU39348.

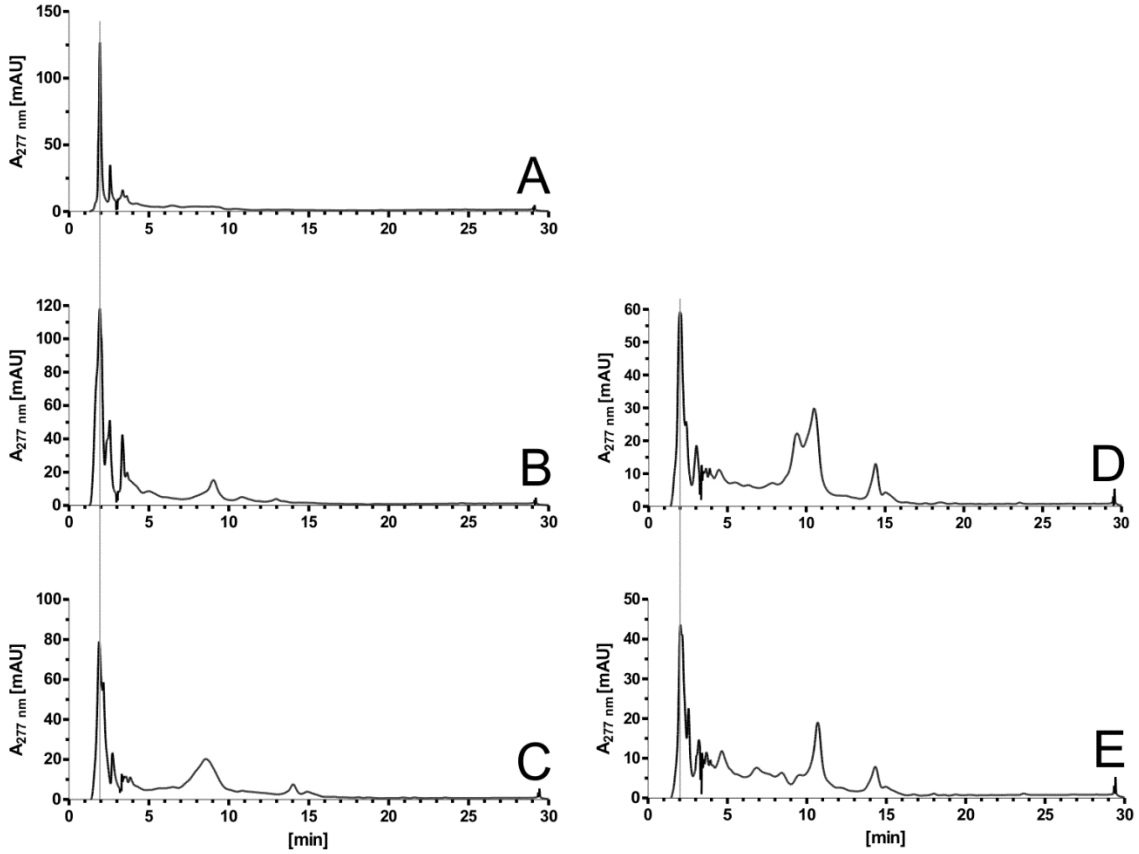


Abbildung 3-17: HPLC-Chromatogramme der Aktivitätstests von TdiB, AstPT und His$_8$-EAU39348 mit DDAQ D. A: DDAQ D-Standard (markiert durch graue Linie). B: Reaktionsansatz mit TdiB. C: Reaktionsansatz mit AstPT. D: Reaktionsansatz mit EAU39348 nach Nickel- und Cobalt-Affinitätschromatographie. E: Reaktionsansatz mit EAU39348 nach Nickel-Affinitätschromatographie. Die Reaktionen wurden in Anwesenheit von 0,5 mM DDAQ D und 2 mM DMAPP durchgeführt. Die Inkubation dauerte 6 h, im Fall von TdiB 1 h. Im Anschluss wurden die Ansätze mit Ethylacetat ausgeschüttelt. Die Auftrennung erfolgte nach der Methode der AQ D-Reaktionen.

Tabelle 3-15: Übersicht über die übrigen, mit His$_8$-EAU39348 getesteten Substrate.

Benzochinone	Asterrichinon D	**Cyclische Peptide**	*cyclo*-Gly-L-Tyr
Terphenyle	Dehydroxyterphenyllin		*cyclo*-L-Phe-L-Ser
	2'-Hydroxy-5'-methoxyterphenyl-4,4''-diol		*cyclo*-L-Phe-L-Trp
			cyclo-L-Pro-L-Trp
Xanthone	1,3,6-Trihydroxyxanthon		*cyclo*-L-Pro-L-Tyr
	1,3,7-Trihydroxyxanthon		*cyclo*-L-Ser-L-Tyr
	1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon		*cyclo*-L-Trp-L-Trp
	1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon		*cyclo*-L-Trp-L-Tyr
			cyclo-L-Tyr-L-Tyr
			cyclo-L-Tyr-Ant
			cyclo-L-Tyr-Ant-Ant
In Anwesenheit von 2 mM DMAPP konnte nach Inkubation für 16 h bei 37 °C keine Umsetzung beobachtet werden.			

3.1.4. Untersuchung von Sekundärmetabolitprofilen von Kulturen von *Aspergillus terreus* DSM 1958 und A1156

3.1.4.1. Kultivierung von *A. terreus* DSM 1958 und A1156 und Extraktion von Sekundärmetaboliten

Während die codierende Sequenz von AstPT (EAU29429) aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958 amplifiziert wurde, war dies für EAU39348 nicht möglich. Erst mit Verwendung der gDNA von *A. terreus* A1156 konnte die codierende Sequenz erhalten werden. Da A1156 dem sequenzierten Stamm NIH 2624 entspricht, der die Grundlage der vorliegenden, bioinformatischen Arbeiten lieferte, musste die Sequenz von EAU39348 in diesem Stamm verfügbar sein. Da EAU39348 nun aber wahrscheinlich eher für die Prenylierung von DDAQ D statt für AQ D verantwortlich ist, sollte untersucht werden, ob die beiden Stämme in der Lage sind, Bisindolylbenzochinone und prenylierte Derivate zu synthetisieren. Beide Stämme wurden jeweils in 100 ml HME-Flüssigmedium in 300 ml-Erlenmeyerkolben bei 30 °C und 120 rpm unter Lichtausschluss für 10 Tage kultiviert. Mycel und Kulturfiltrat wurden anschließend getrennt und jeweils mit Ethylacetat extrahiert.

3.1.4.2. LC/MS-Analysen von Extrakten von *A. terreus*

Die erhaltenen Rohextrakte aus Mycelien und Kulturfiltraten von *A. terreus* DSM 1958 und A1156 wurden mittels LC/MS auf die Anwesenheit von Bisindolylbenzochinonen und prenylierten Derivaten hin untersucht. Die Chromatogramme sind im Anhang unter 6.5 wiedergegeben.

$[M+H]^+$-Ionen mit Massen von *m/z* = 467,1966 und *m/z* = 535,2588, welche denen von mono- und diprenylierten Derivaten von AQ D entsprechen, konnten nur im Extrakt des Mycels von *A. terreus* DSM 1958, in Extrakten von A1156 allerdings überhaupt nicht detektiert werden. Sogar Spuren von unprenyliertem AQ D waren im Extrakt des Mycels von *A. terreus* DSM 1958 zu erkennen, während $[M+H]^+$-Ionen mit den Massen *m/z* = 507,2288 bzw. 507,2281, welche diprenyliertem DDAQ D entsprechen, sowohl in Extrakten vom Mycel von A1156 und vom Kulturfiltrat von DSM 1958 wiederzufinden waren. Im Kulturfiltrat von DSM 1958 konnte außerdem ein $[M+H]^+$-Ion mit *m/z* = 439,1658 detektiert werden, was der Masse von einem monoprenylierten Derivat von DDAQ D entspricht.

Beide Stämme von *A. terreus*, DSM 1958 und A1156, waren demzufolge offenbar in der Lage, prenylierte und unmethylierte Bisindolylbenzochinone zu produzieren, während die entsprechenden methylierten Derivate nur in DSM 1958 zu finden waren.

3.1.5. Klonierung und Expressionsversuche von EAQ91749 aus *Chaetomium globosum*

3.1.5.1. Amplifikation von *CHGG_03684* aus gDNA von *C. globosum* DSM 1962

Nachdem der Versuch, die codierende Sequenz von EAQ91749 aus mRNA zu amplifizieren, nicht erfolgreich war, sollte die Sequenz, wie bereits für *astPT* und *ATEG_00702* erfolgreich durchgeführt, mittels Fusions-PCR amplifiziert werden. Die drei Exons wurden aus gDNA von *C. globosum* DSM 1962 amplifiziert, der identisch ist mit dem sequenzierten Stamm *C. globosum* CBS 148.51. Zur Amplifikation des ersten Exons wurde das Primerpaar CHGG_03684_for und CHGG_03684_fus_1 eingesetzt, für das zweite Exon CHGG_03684_fus_2 und CHGG_03684_fus_3 und für das dritte Exon CHGG_03684_fus_4 und CHGG_03684_rev_1 bzw. CHGG_03684_rev_2.

CHGG_03684_for führte eine BamHI-Schnittstelle ein, CHGG_03684_rev_1 eine NotI- und CHGG_03684_rev_2 eine BglII-Schnittstelle. Die beiden rückwärtsgerichteten Primer sollten verschiedene Schnittstellen zur späteren Klonierung in pQE-70 bzw. pHIS8 liefern. CHGG_03684_rev_2 mutierte außerdem das Stop-Codon zu einem Tyrosin, um bei einer späteren Überproduktion in pQE-70 die Transkription und Translation eines C-terminalen His_6-*tags* zu ermöglichen. Die einzelnen Exons wurden in weiteren PCR-Reaktionen miteinander fusioniert. Abbildung 3-18 zeigt jeweils die amplifizierten Exons und die fusionierten Sequenzen.

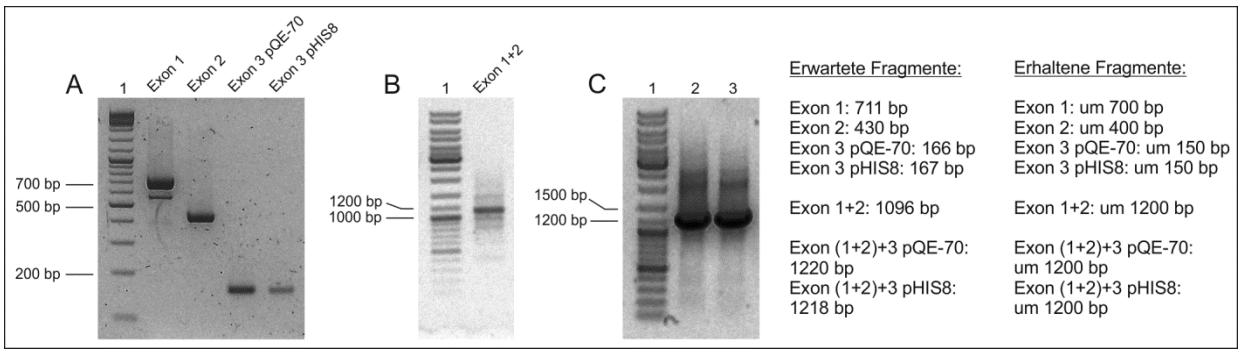


Abbildung 3-18: Agarosegele der PCR-Amplifikationen von *CHGG_03684* aus gDNA von *C. globosum* DSM 1962. A: 2%iges Agarosegel, Amplifikation der Exons 1 und 2 und Exons 3 jeweils mit Schnittstellen für pQE-70 und pHIS8. B: 2%iges Agrosegel, Fusion der Exons 1 und 2. C: 0,8%iges Agrosegel, Fusion der Exons (1+2) mit Exon 3. Spur 1: jeweils DNA-Größenstandard. Spur 2: Fusion mit Exon 3 für pQE-70. Spur 3: Fusion mit Exon 3 für pHIS8.

3.1.5.2. Klonierung und Transformation

Die erfolgreich amplifizierten Sequenzen von *CHGG_03684* wurden mittels TA-Klonierung in pGEM-T® easy eingebracht. Nach Transformation in *E. coli* XL1-blue MRF‘ durch Hitzeschock wurden die erhaltenen Kolonien mittels Blau-Weiß-Screening sortiert und

potenziell positive Klone weiterkultiviert. Die Plasmide wurden isoliert und einem PvuII-Verdau unterzogen. pST14 (Abbildung 3-19) und pST19 (Abbildung 3-20) zeigten das korrekte Restriktionsmuster und ihre Sequenz konnte durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

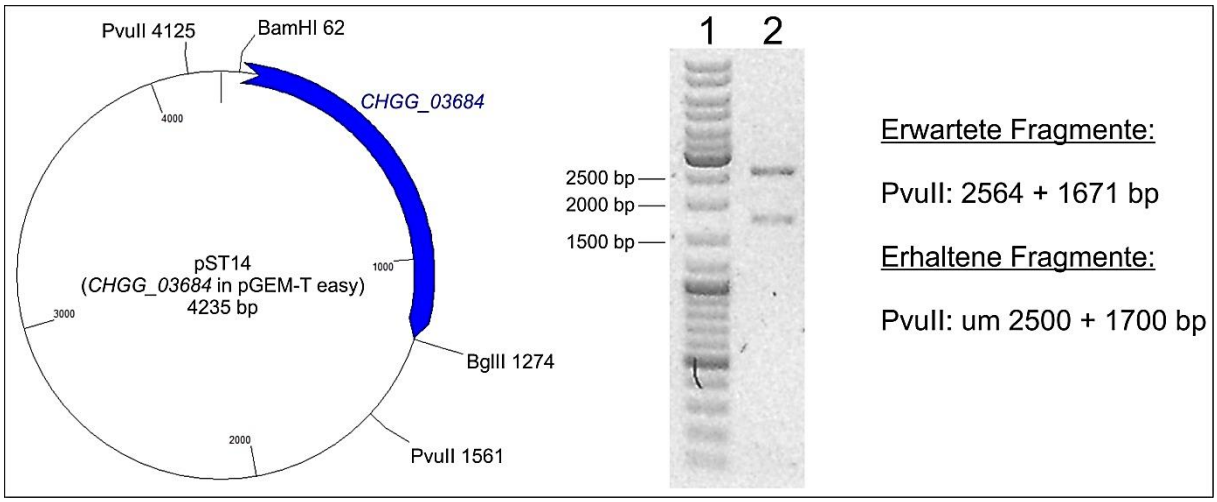


Abbildung 3-19: Vektorkarte von pST14 (*CHGG_03684* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. PvuII diente der Restriktionskontrolle, BamHI und BglII wurden zur Umklonierung in pQE-70 verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: PvuII-verdautes pST14.

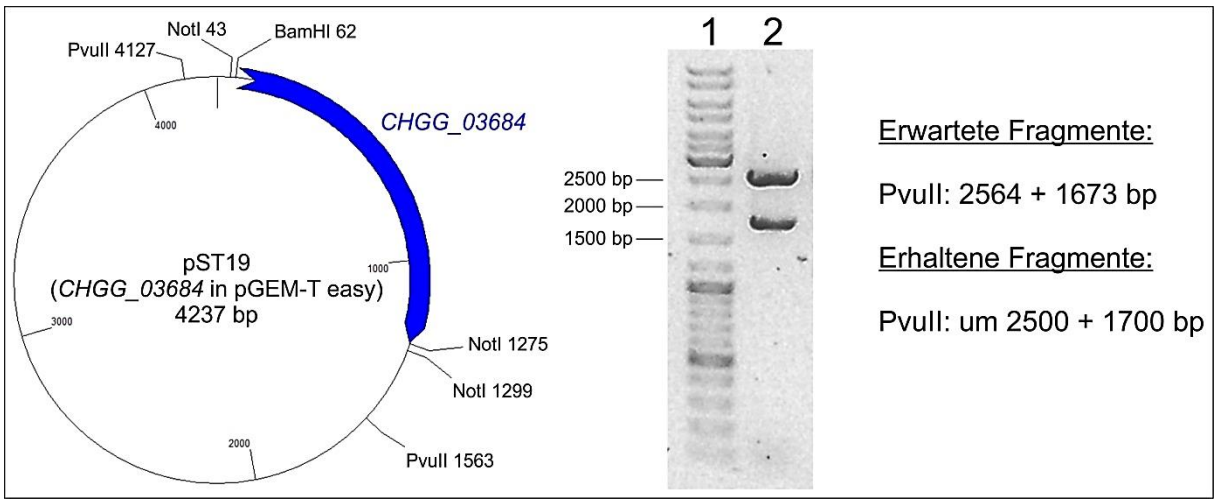


Abbildung 3-20: Vektorkarte von pST19 (*CHGG_03684* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. PvuII diente der Restriktionskontrolle, BamHI und NotI wurden zur Umklonierung in pHIS8 verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: PvuII-verdautes pST19.

pST14 und pQE-70 wurden einem Doppelverdau mit BamHI und BglII unterzogen. Da diese beiden Enzyme kompatible Enden liefern, wurde pQE-70 zusätzlich mittels SAP dephosphoryliert. Die erhaltenen Fragmente, 1212 bp für *CHGG_03684* und 3420 bp für pQE-70, wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt, aufgereinigt und miteinander ligiert. Nach Transformation und Isolierung der Plasmide zeigte pST18 das

erwartete Restriktionsmuster mit intakten BamHI- und BglII-Schnittstellen (Abbildung 3-21). Auch konnte die korrekte Sequenz durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

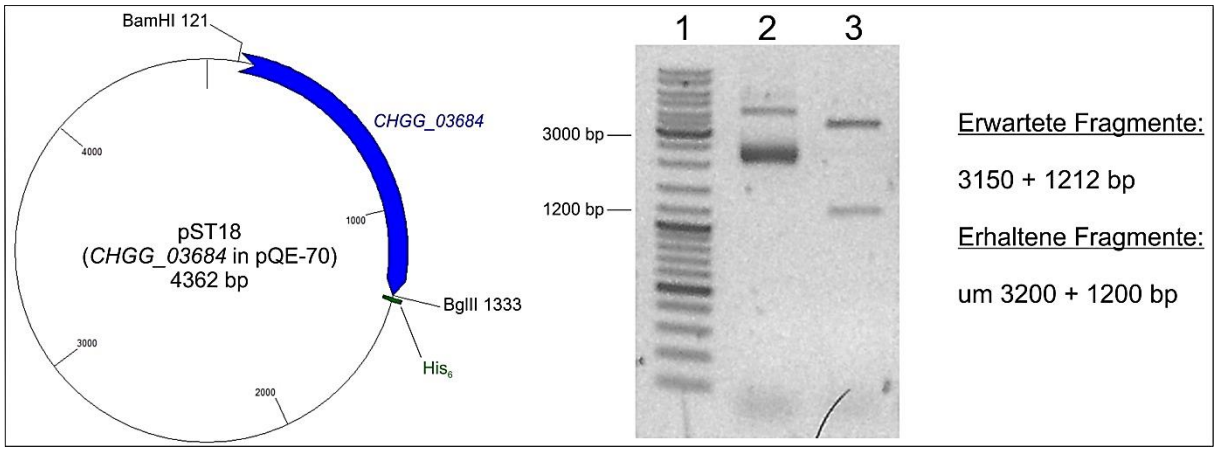


Abbildung 3-21: Vektorkarte von pST18 (*CHGG_03684* in pQE-70) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. BamHI und BglII dienten der Umklonierung und der Restriktionskontrolle. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: unverdauter Leervektor pQE-70. Spur 3: BamHI-BglII-verdautes pST18.

Daneben wurden pST19 und pHIS8 einem Doppelverdau mit BamHI und NotI unterzogen. Die erhaltenen Fragmente, 1213 bp für *CHGG_03684* und 5301 bp für pHIS8, wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt, aufgereinigt und miteinander ligiert. Nach Transformation und Isolierung der Plasmide zeigte pST20 das erwartete Restriktionsmuster (Abbildung 3-22). Die korrekte Sequenz konnte außerdem durch eine Sequenzierung bestätigt werden.

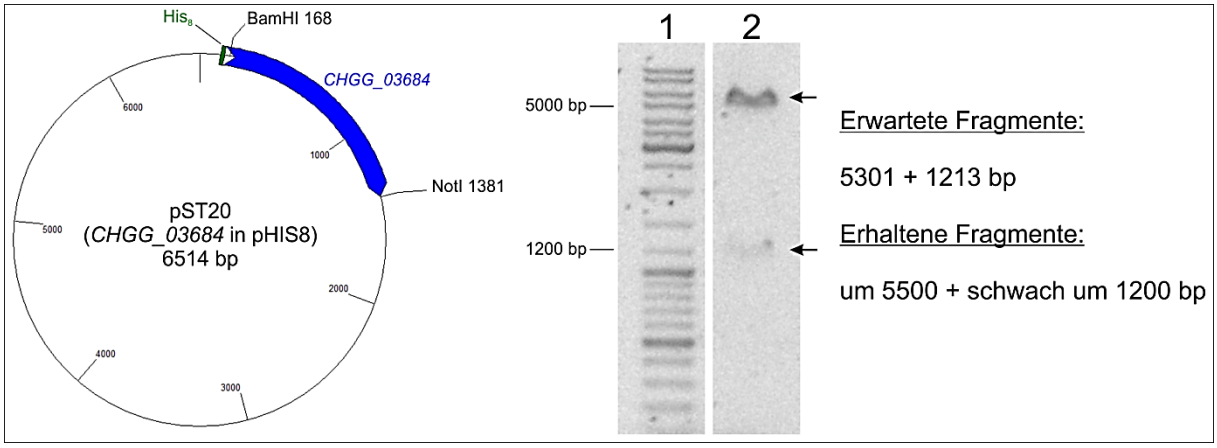


Abbildung 3-22: Vektorkarte von pST20 (*CHGG_03684* in pHIS8) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. BamHI und NotI dienten der Umklonierung und der Restriktionskontrolle. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: BamHI-NotI-verdautes pST20.

CHGG_03684 wurde weiterhin in den Vektor pYES2/NT C zur Expression in *S. cerevisiae* umkloniert. Dazu wurden pST19 und pYES2/NT C einem Doppelverdau mit BamHI und NotI unterzogen. Die erhaltenen Fragmente, 1213 bp für *CHGG_03684* und 5975 bp für pYES2/NT C, wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt,

aufgereinigt und miteinander ligiert. Nach Transformation und Isolierung der Plasmide zeigte pST21 das erwartete Restriktionsmuster (Abbildung 3-23).

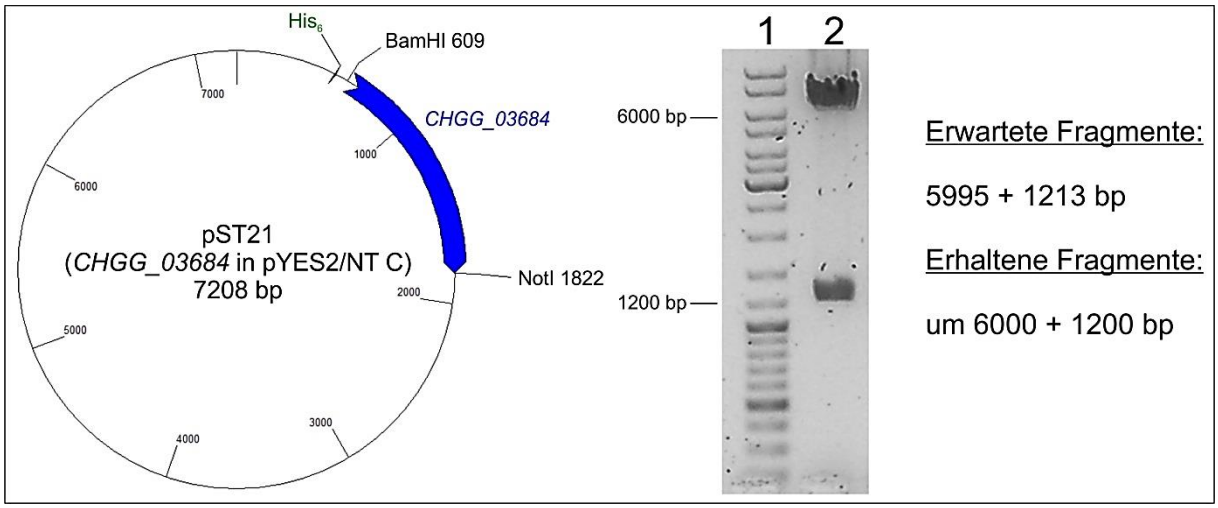


Abbildung 3-23: Vektorkarte von pST21 (*CHGG_03684* in pYES2/NT C) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. BamHI und NotI dienten der Umklonierung und der Restriktionskontrolle. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: BamHI-NotI-verdautes pST21.

CHGG_03684 wurde ferner in den Vektor pGEX-4T-1 zur Expression mit GST-*tag* umkloniert. Dazu wurden pST19 und pGEX-4T-1 einem Doppelverdau mit BamHI und NotI unterzogen. Die erhaltenen Fragmente, 1213 bp für *CHGG_03684* und 4939 bp für pGEX-4T-1, wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt, aufgereinigt und miteinander ligiert. Nach Transformation und Isolierung der Plasmide zeigte pST34 das erwartete Restriktionsmuster (Abbildung 3-24).

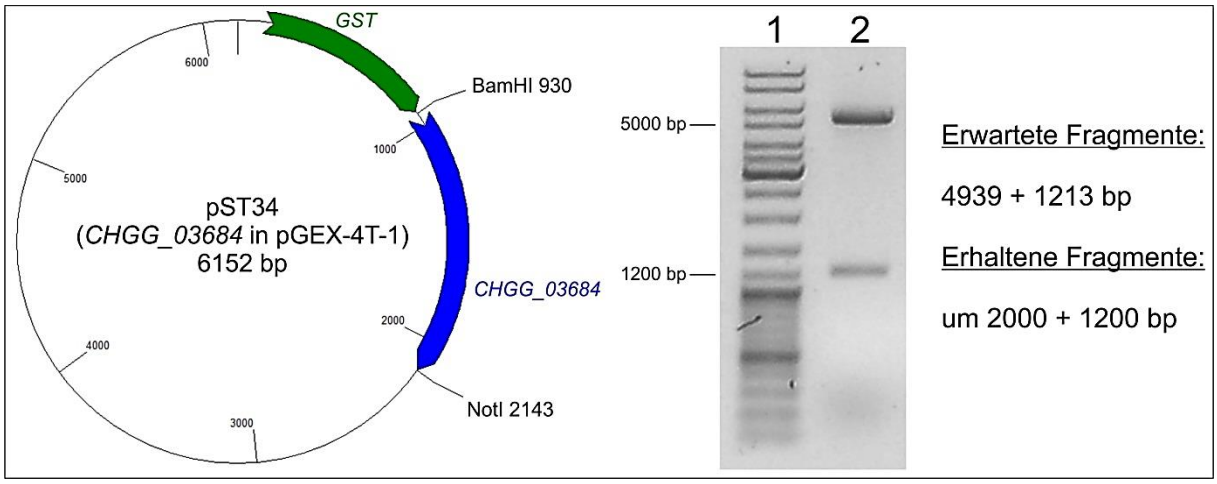


Abbildung 3-24: Vektorkarte von pST34 (*CHGG_03684* in pGEX-4T-1) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. BamHI und NotI dienten der Umklonierung und der Restriktionskontrolle. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: BamHI-NotI-verdautes pST34.

An pST18 wurde außerdem eine zielgerichtete Mutagenese durchgeführt, um die Expression ohne zusätzliche Affinitäts-*tags* zu testen. Dazu wurde mit den Primern 03684_C1206G_for und 03684_C1206G_rev ein Tyrosin zum ursprünglich enthaltenen Stop-Codon zurückmutiert (Abbildung 3-25). Eine Sequenzierung von pST36 bestätigte die Mutation.

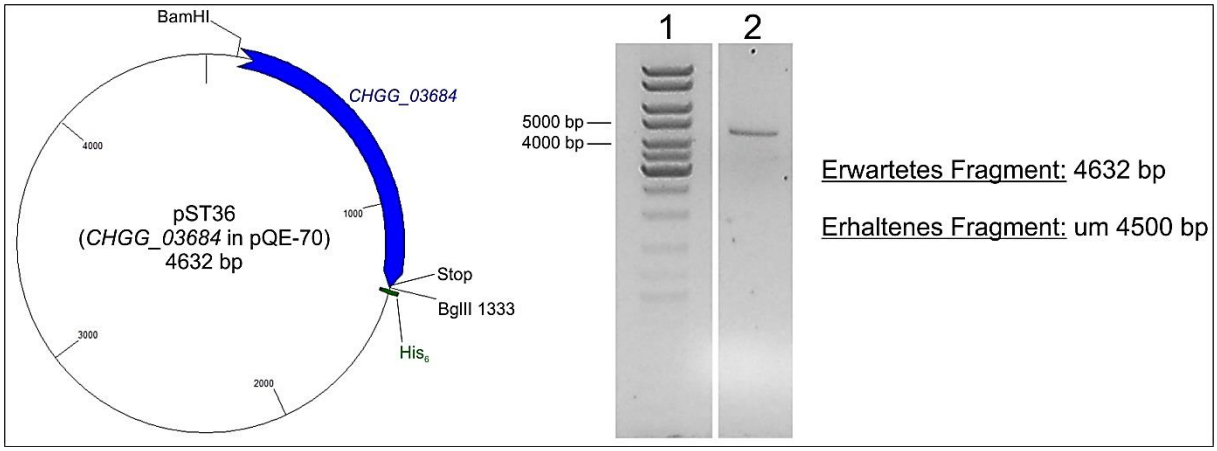


Abbildung 3-25: Vektorkarte von pST36 (*CHGG_03684* mit zurückmutiertem Stop-Codon in pQE-70) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: BamHI- verdautes pST36.

3.1.5.3. Überproduktion und Reinigungsversuche von EAQ91749

3.1.5.3.1. Überproduktion von EAQ91749 in *E. coli*

Die Expressionsplasmide pST18, pST20, pST34 und pST36 wurden mittels Hitzeschock in geeignete *E. coli*-Stämme eingebracht und zur Überproduktion von EAQ91749 bei verschiedenen Bedingungen getestet. Die vier Expressionskonstrukte sollten dabei Proteine mit C- oder N-terminalem His-*tag*, GST-*tag* oder ohne Affinitäts-*tag* mit Molekulargewichten zwischen 44 und 70 kDa liefern (Tabelle 3-16). Es wurden im 100 ml-Maßstab verschiedene Bedingungen wie Kultivierungs- und Induktionstemperaturen (jeweils 37, 30 oder 22 °C), IPTG-Konzentrationen (0, 0,05, 0,06, 0,1, 0,5 oder 1,0 mM) und Induktionsdauern (0,5 bis 120 h) überprüft (Tabelle 3-17 und Tabelle 3-18). Die geernteten Zellen wurden aufgeschlossen und die Proteine mittels SDS-PAGE analysiert.

Tabelle 3-16: Übersicht über die getesteten, bakteriellen Expressionskonstrukte für EAQ91749 und sich daraus ergebende Proteine mit Molekulargewichten.

Plasmid	Protein	Molekulargewicht [kDa]
pST18	EAQ91749-His_6	45,8
pST20	His_8-EAQ91749	46,3
pST34	GST-EAQ91749	70,2
pST36	EAQ91749	43,9

Tabelle 3-17: Getestete Expressionsbedingungen für EAQ91749 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen mit T5-reguliertem Expressionssystem.

Stamm	Plasmid	Medium	Kultivierungs-temperatur [°C]	Induktion [mM IPTG]	Induktions-temperatur [°C]	Induktions-dauer [h]
XL1-Blue MRF'	pST18	LB	37	0,1	37	0,5
		LB	37	0,1	37	3
		LB	37	0,1	37	4,5
		LB	37	0,1	37	6
		LB	37	0,1	37	16
		LB	37 (OD_{600}: 0,4)	0,1	37	16
		LB	37 (OD_{600}: 0,9)	0,1	37	0,5
		LB	37	0,1	30	3
		LB	37	0,05	30	18
		LB	37	0,1	22	3
		LB	37	0,1	4	18
		LB	37	0,1	4	120
		LB	37	0	37	22
		LB	37	0	22	15
		LB	22 (OD_{600}: 0,9)	0,1	4	24
		LB[1]	37	0,1	37	3
		LB[1]	37 (OD_{600}: 0,8)	0,1	37	18
		LB[2]	37 (OD_{600}: 0,8)	0,1	37	3
		LB[3]	37 (OD_{600}: 0,3)	0,1	37	16
		LB[4]	37 (OD_{600}: 0,4)	0,1	37	16
	pST36	LB	37	0,1	37	2
		LB	37	0,1	37	16
		LB	37	0,1	30	16
		LB	22	0,1	22	16
M15 [pREP4]	pST18	LB	37	0,1	37	6
		LB	37	0,1	37	3
		LB	37	0,1	30	16
		LB	37	0,1	22	6
		LB	37	0	37	20
		LB[1]	37 (OD_{600}: 1,1)	0,1	37	3
		LB[2]	37	0,1	37	3
		LB[4]	37	0,1	37	19
		TB	37	0,1	37	3
SG13009 [pREP4]	pST18	LB	37	0,1	37	18

Die Expression wurde jeweils im 100 ml-Maßstab durchgeführt. Induziert wurde, sofern nicht anders angegeben, bei einer OD_{600} von 0,6. [1]: zusätzlich 60 µM Tween 20. [2]: zusätzlich 0,2 M $MgCl_2$. [3]: zusätzlich 1 M $MgCl_2$. [4]: zusätzlich 20% (w/v) Sorbit.

In Abbildung 3-26 ist beispielhaft ein Aufreinigungsversuch mit einem typischen Ergebnis gezeigt. Vergleicht man die beiden Fraktionen des Gesamtproteins vor und nach Induktion, zeigt sich, dass die Überproduktion eines Proteins knapp unterhalb der 45 kDa-Markerbande stattgefunden hat. Diese Bande fand sich noch verstärkt in der Fraktion des unlöslichen Gesamtproteins, also nach Trennung vom löslichen Gesamtprotein durch Zentrifugation. Sofern also eine Überproduktion stattfand, konnte eine große Menge Protein erhalten werden, die allerdings unlöslich blieb. Zu hohe Expressionsraten können häufig zur Bildung von unlöslichem Protein in Form von Einschlusskörpern aus fehlerhaft gefalteten Proteinen führen (van den Berg *et al.,* 1999).

Tabelle 3-18: Getestete Expressionsbedingungen für EAQ91749 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen mit T7-reguliertem Expressionssystem.

Stamm	Plasmid	Medium	Kultivierungs-temperatur [°C]	Induktion [mM IPTG]	Induktions-temperatur [°C]	Induktions-dauer [h]
BL21 (DE3) pLysS	pST20	LB	37	0,1	37	19
		LB	22	0,06	22	7
	pST34	LB	37	0,1	37	1,75
		LB	37	0,1	37	2,5
		LB	37	0,1	37	4,5
Rosetta 2 (DE3) pLysS	pST20	LB	37	0,5	37	16
		LB	37	0,5	30	16
		LB	37	0,5	22	16
		LB	37	0	37	16
		LB	37 (OD_{600}: 0,8)	0,1	37	3
		LB	37 (OD_{600}: 0,8)	0,05	37	3
		LB	37 (OD_{600}: 0,4)	0,1	37	3
		LB	37 (OD_{600}: 1,5)	0,1	37	3
		LB	37 (OD_{600}: 0,8)	0,1	22	3
		LB	37 (OD_{600}: 0,8)	0,05	22	3
SoluBL21™	pST20	LB	37	1	37	6
		LB	37	1	37	16
		LB	37	1	30	6
		LB	37	1	22	6
		LB	37	1	4	72
		M9	37	1	37	16
		M9	22	1	22	16
ArcticExpress RIL	pST20	LB	30 (3 h)[1]	0,1	12	24
		LB	30 (3 h)[1]	0,1	12	46
		LB	30 (3 h)[1]	0,5	12	24
		LB	30 (3 h)[1]	0,5	12	46
		LB	30 (3 h)[1]	1,0	12	24
		LB	30 (3 h)[1]	1,0	12	46
ArcticExpress (DE3) RIL	pST20	LB	30 (3 h)[1]	0,1	12	24
		LB	30 (3 h)[1]	0,1	12	46
		LB	30 (3 h)[1]	0,5	12	24
		LB	30 (3 h)[1]	0,5	12	46
		LB	30 (3 h)[1]	1,0	12	24
		LB	30 (3 h)[1]	1,0	12	46

Die Expression wurde jeweils im 100 ml-Maßstab durchgeführt. Induziert wurde, sofern nicht anders angegeben, bei einer OD_{600} von 0,6. [1]: Nach Herstellerangaben wurde die Hauptkultur nach Inokulierung für 3 h bei 30 °C inkubiert.

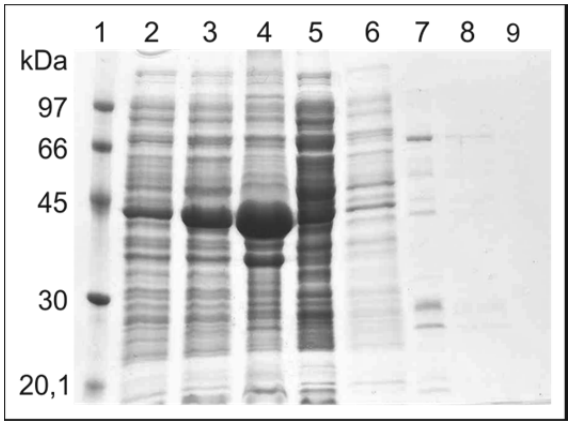


Abbildung 3-26: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAQ91749-His$_6$ aus *E. coli* XL1-Blue MRF' (pST18). Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion. Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion. Spur 4: unlösliches Gesamtprotein. Spur 5: Durchflussfraktion. Spur 6: erste Waschfraktion. Spur 7: erste Elutionsfraktion. Spur 8: zweite Elutionsfraktion. Spur 9: zweite Elutionsfraktion.

Die Überproduktion wurde meist mit 0,1 mM IPTG induziert, doch auch mit anderen Konzentrationen als auch gänzlich ohne IPTG konnte kein lösliches Protein erhalten werden. Verkürzte Induktionszeiten oder niedrige Induktionstemperaturen sollen zu niedrigeren Expressionsraten führen und wurden ebenfalls getestet, führten aber nicht zu einer erfolgreichen Aufreinigung. Daneben wurden den Medien verschiedene Stoffe wie Mg^{2+}, Sorbit oder Tween® 20 zugesetzt, die die Produktion von löslichem Protein begünstigen sollen. So soll der Zusatz von Sorbit den osmotischen Druck in der Zelle erhöhen und damit die Produktion von schützenden Proteinen fördern, die auch einen positiven Einfluss auf die Struktur des überproduzierten Proteins haben können (Blackwell & Horgan 1991; Oganesyan *et al.,* 2007). Die Zusätze führten teilweise zu einer noch stärkeren Expression, aber nicht zur Produktion von löslichem Protein.

Neben der Überproduktion als Polyhistidin-Fusionsprotein wurde mit pST34 die Expression als GST-Fusionsprotein getestet, was häufig die Bildung von löslichem Protein erleichtern soll (Terpe 2003). Doch auch hier fand eine starke Produktion von unlöslichem Protein statt. Um den Einfluss der Affinitäts-*tags* auf die Löslichkeit von EAQ91749 zu testen, wurde das Protein ohne Fusions-*tag* mittels pST36 überproduziert. Dabei blieb das Protein ebenfalls unlöslich. Mit den beiden Stämmen ArcticExpress RIL und ArcticExpress (DE3) RIL wurden Expressionsstämme getestet, die bei einer niedrigen Induktionstemperatur von 12 °C zusätzlich Chaperone koexprimieren, die eine korrekte Faltung der überproduzierten Proteine begünstigen sollen. Doch auch hier konnte nur unlösliches Protein erhalten werden.

3.1.5.3.2. Überproduktion von EAQ91749 in *S. cerevisiae*

Da die Überproduktion in *E. coli* bisher nur unlösliches Protein lieferte, wurde mit pST21 die Expression in *S. cerevisiae* INVSc1 getestet. Die Kultivierung und Induktion wurde nach Herstellerangaben im 1000 ml-Maßstab durchgeführt. Nach 24 h Induktion mit 1% (w/v) Raffinose wurden die Zellen geerntet und das lösliche Gesamtprotein einer Ni-NTA-Aufreinigung unterzogen. Das aus pST21 resultierende His_6-EAQ91749 hat ein theoretisches Molekulargewicht von 47,7 kDa. Eine Überproduktion des Proteins konnte allerdings mittels SDS-PAGE nicht nachgewiesen werden.

3.1.5.3.3. Überproduktion von EAQ91749 in Einschlusskörpern, Versuche zur Solubilisierung und zur Rückfaltung und Aktivitätstests

pST18 wurde in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ dazu genutzt, um EAQ91749 in Form von Einschlusskörpern zu gewinnen und anschließend Aufreinigungen unter denaturierenden Bedingungen zu testen. Dazu wurde die Überproduktion mit 1 mM IPTG induziert, um so größere Mengen der Einschlusskörper ernten zu können. Zwei verschiedene Methoden zur

Solubilisierung wurden getestet, anschließend wurde die Rückfaltung jeweils mittels Dialyse versucht.

Das erste Solubilisierungsprotokoll wurde dem *Protein Refolding Manual* der Firma Novagen entnommen. Darin soll N-Laurylsarcosin in 500 mM CAPS-Puffer (pH 11,0) die Einschlusskörper lösen. Nach Solubilisierung und Dialyse wurde die erhaltene Lösung einer Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose unterzogen. Abbildung 3-27 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE der verschiedenen Fraktionen. Wieder war eine verstärkte Bande um 45 kDa nach Induktion zu erkennen (Spur 3). Vergleicht man die Proben aus der Solubilisierung, wird ersichtlich, dass der größte Teil des überproduzierten Proteins nicht in die lösliche Form überführt werden konnte (Spur 4). Der Überstand aus der Solubilisierung (Spur 5) wurde mit Ni-NTA-Agarose versetzt, das Protein schien allerdings nicht gebunden zu haben, da der Großteil in der Durchflussfraktion wiedergefunden (Spur 6) wurde. Schließlich konnte eine geringe Menge des Proteins eluiert werden (Spur 9, Pfeil).

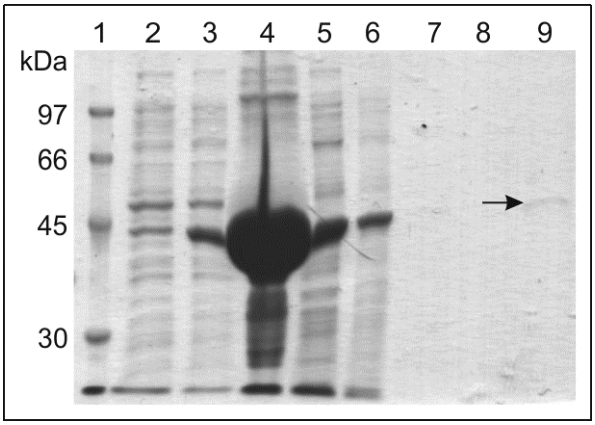


Abbildung 3-27: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAQ91749-His$_6$ aus *E. coli* XL1-Blue MRF' (pST18) nach Solubilisierung mit N-Lauryl-sarocin, Dialyse und Ni-NTA-Reinigung. Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: Gesamtprotein vor Induktion. Spur 3: Gesamtprotein nach Induktion. Spur 4: Rückstand der Solubilisierung. Spur 5: solubilisiertes Gesamtprotein. Spur 6: Durchfluss der Ni-NTA-Reinigung. Spur 7: erste Waschfraktion. Spur 8: zweite Waschfraktion. Spur 9: erste Elutionsfraktion.

Der zweite Solubilisierungsversuch wurde nach einem modifizierten Protokoll von Sutherland Maciver (*Department of Biomedical Sciences*, Universität Edinburgh) (2.6.2.4) durchgeführt. Hier wurden die Einschlusskörper in Anwesenheit von Desoxycholat gewaschen und anschließend mit 8 M Harnstoff solubilisiert. Der Dialyse schloss sich wiederum eine Reinigung mittels Ni-NTA-Agarose an. Die gesammelten Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Ein Vergleich der Proben vor (Spur 6) und nach Harnstoffbehandlung (Spur 7) zeigte, dass die Solubilisierung erfolgreich war, da eine vergleichbare Bande um 45 kDa wiedergefunden werden konnte. Allerdings hatte ein großer Anteil des Proteins nicht an die Ni-NTA-Agarose gebunden und ging während der nachfolgenden Aufreinigung verloren (Spur 8). Insgesamt konnten etwa 0,5 mg Protein je Liter Kultur aufgereinigt und in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) mit 15% (v/v) Glycerin umgepuffert werden (Spur 14, Pfeil).

Das aufgereinigte Protein wurde auf seine Aktivität bezüglich AQ D hin untersucht. Dabei wurden etwa 10 µg Protein mit 0,5 mM Asterrichinon D (AQ D) in Anwesenheit von

2 mM DMAPP und 5 mM $CaCl_2$ in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) für 16 h bei 37 °C inkubiert. Allerdings konnte keine Umsetzung beobachtet werden.

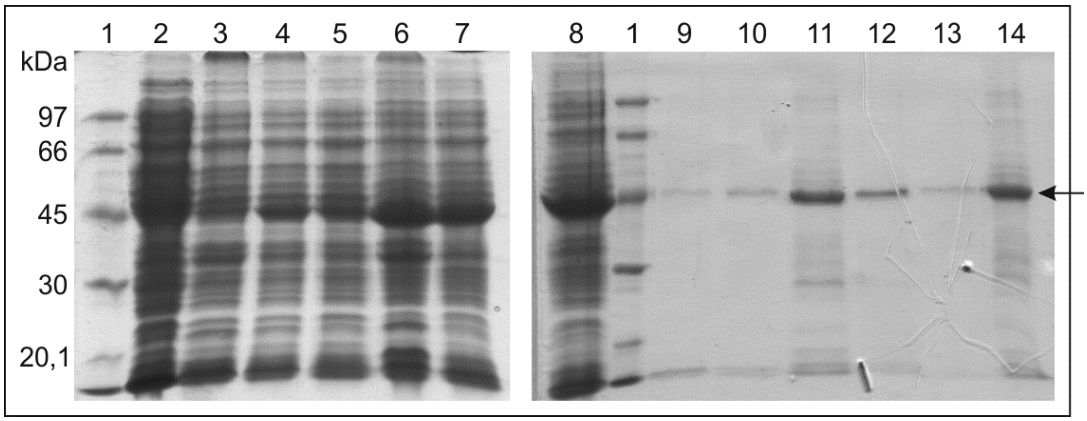


Abbildung 3-28: SDS-PAGE der Aufreinigung von EAQ91749-His$_6$ aus *E. coli* XL1-Blue MRF' (pST18) nach Solubilisierung mit Harnstoff, Dialyse und Ni-NTA-Reinigung. Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: lösliches Gesamtprotein vor Solubilisierung. Spur 3, 4, 5: Überstände der drei Waschschritte mit Desoxycholat. Spur 6: gewaschenes Pellet vor Solubilisierung. Spur 7: solubilisiertes Gesamtprotein aus Einschlusskörpern. Spur 8: Durchfluss der Ni-NTA-Reinigung. Spur 9: erste Waschfraktion. Spur 10: zweite Waschfraktion. Spur 11: erste Elutionsfraktion. Spur 12: zweite Elutionsfraktion. Spur 13: dritte Elutionsfraktion. Spur 14: erste Elutionsfraktion nach Pufferwechsel über PD-10-Säule.

3.1.5.4. Sequenzanalysen

EAQ91749 konnte in verschiedenen bakteriellen Expressionssystemen überproduziert werden, lag dabei aber immer in Form von unlöslichen Einschlusskörpern vor. Der Einschluss in unlöslicher Form war dabei unabhängig vom Vorhandensein eines zur Aufreinigung vorgesehenen Affinitäts-*tags*, da mit allen getesteten *tags* (N-terminaler His$_8$-, C-terminaler His$_6$- und N-terminaler GST-*tag*) als auch gänzlich ohne *tag* nur unlösliches Protein erhalten werden konnte. Eine Überproduktion im eukaryotischen System, in *S. cerevisiae*, war nicht erfolgreich. Da die Amplifikation der Sequenz von EAQ91749 aus mRNA nicht erfolgreich war, wurde bei allen Arbeiten auf die putative Sequenz des *Broad Institute* (Cambridge, MA, USA) zurückgegriffen, die mittels FGENESH vorhergesagt wurde. Da es bei diesem Programm keine einstellbaren Parameter für *C. globosum* gibt, und es bei den Daten des *Broad Institute* nicht ersichtlich ist, welche Parameter für die Analyse verwendet wurden, wurde eine neue Analyse mithilfe der wahrscheinlichsten Parameter von verschiedenen Ascomyceten durchgeführt. Dabei waren Parameter von *Alternaria brassicicola*, *Penicillium funiculosum*, *Emericella* und *Penicillium* verfügbar. Alle Vorhersagen stimmten in der Hinsicht überein, dass die genomische Sequenz drei Exons enthält. Auch das erste Exon wurde jedes Mal identisch vorhergesagt. Die Vorhersagen weichen allerdings in dem Beginn des zweiten und im Ende des dritten Exons ab. Da bei der Position 1396 bp kein Stopcodon enthalten ist, sind die Sequenzen EAQ91749-Pf (mit Parametern für *Penicillium funiculosum*) und EAQ91749-Emericella (mit Parametern für *Emericella*) eher un-

```
EAQ91749-Broad          MATVDTIVAQPQAGKTQVAEQKTAHEFWSDYLCSMVQPLLQASGAYTPEQQAQQLRFLTD 60
EAQ91749-Ab             MATVDTIVAQPQAGKTQVAEQKTAHEFWSDYLCSMVQPLLQASGAYTPEQQAQQLRFLTD 60
EAQ91749-Pf             MATVDTIVAQPQAGKTQVAEQKTAHEFWSDYLCSMVQPLLQASGAYTPEQQAQQLRFLTD 60
EAQ91749-Emericella     MATVDTIVAQPQAGKTQVAEQKTAHEFWSDYLCSMVQPLLQASGAYTPEQQAQQLRFLTD 60
EAQ91749-Penicillium    MATVDTIVAQPQAGKTQVAEQKTAHEFWSDYLCSMVQPLLQASGAYTPEQQAQQLRFLTD 60
TdiB-An                 ----------------------MATEYWSRHLRSVLAPLFAAAGTYSPEDQESHLAFIDE 38
AstPT-At                -MTIHTD-------LPPPEAKASDTEFWSEHIRSVIGPLMKATGSYSGTAQEANLRFLDN 52
                                               *:** :: *:: **: *:*:*:   *  .* *: :

EAQ91749-Broad          HIAPTLGPLPSQARAKYTM--TYCDSPFEPSLNLTSTSKCKVRYSLEVVKPGGGADGPDP 118
EAQ91749-Ab             HIAPTLGPLPSQARAKYTM--TYCDSPFEPSLNLTSTSKCKVRYSLEVVKPGGGADGPDP 118
EAQ91749-Pf             HIAPTLGPLPSQARAKYTM--TYCDSPFEPSLNLTSTSKCKVRYSLEVVKPGGGADGPDP 118
EAQ91749-Emericella     HIAPTLGPLPSQARAKYTM--TYCDSPFEPSLNLTSTSKCKVRYSLEVVKPGGGADGPDP 118
EAQ91749-Penicillium    HIAPTLGPLPSQARAKYTM--TYCDSPFEPSLNLTSTSKCKVRYSLEVVKPGGGADGPDP 118
TdiB-An                 HIAPNLGPLPWEPHGPYSTPSSLVGSPFDPSINIVSSGKAKVRFDFDVISPPDRT-GPDP 97
AstPT-At                YIAPALGPHPTVAHPTYVAPCTIVGTLFNPSISLSAKGKPTVRFDYDLPLPLDRASSDDP 112
                        :*** *** *   :  *    :   : *:**:.: :..* .**:. ::  *   : . **

EAQ91749-Broad          FGEKRAREVLLALAKASGADTKWLTSIMDLFYLTPEETEAMRHKIPT--FMPSSLCGFDL 176
EAQ91749-Ab             FGEKRAREVLLALAKASGADTKWLTSIMDLFYLTPEETEAMRHKIPT--FMPSSLCGFDL 176
EAQ91749-Pf             FGEKRAREVLLALAKASGADTKWLTSIMDLFYLTPEETEAMRHKIPT--FMPSSLCGFDL 176
EAQ91749-Emericella     FGEKRAREVLLALAKASGADTKWLTSIMDLFYLTPEETEAMRHKIPT--FMPSSLCGFDL 176
EAQ91749-Penicillium    FGEKRAREVLLALAKASGADTKWLTSIMDLFYLTPEETEAMRHKIPT--FMPSSLCGFDL 176
TdiB-An                 FAEGSAREILHRLADLVGADTQWMGYLMDALYLTPAEAEVAKTKLPPGVAIPPSSVGFDF 157
AstPT-At                WGEGKARTLFRRLAAALGADTQWLEYFMARLFLSPAETEALRSKIPADLVIPSAMVGVAF 172
                        :.*  ** ::  **   ****:*:  :*  ::*:* *:*. : *:*    :* :  *. :

EAQ91749-Broad          DGGKAMMKVYILTMRKAIASGSLSSNLYTLDALRKLEPFGDKLGPGLDVVAD-------- 228
EAQ91749-Ab             DGGKAMMKVYILTMRKAIASGSLSSNLYTLDALRKLEPFGDKLGPGLDVVADYLSTVKYN 227
EAQ91749-Pf             DGGKAMMKVYILTMRKAIASGSLSSNLYTLDALRKLEPFGDKLGPGLDVVADYLSTVKYN 227
EAQ91749-Emericella     DGGKAMMKVYILTMRKAIASGSLSSNLYTLDALRKLEPFGDKLGPGLDVVA-------- 236
EAQ91749-Penicillium    DGGKAMMKVYILTMRKAIASGSLSSNLYTLDALRKLEPFGDKLGPGLDVVA-------- 236
TdiB-An                 DGPERTLKFYIPSVRKALATGQDVSE-LMLKTLRGLQPLGSELVPAMDLIASYLSTRTND 216
AstPT-At                DDAQPRLKAWVPTMRRAILEGRSSNE-IAVEVLRGLSPLGSEITPAIDMVEAWIAASPHD 231
                        *  :  :* :: ::*:*:  *   .:   :..** *.*:*.:: *.:*::

EAQ91749-Broad          ----------------------------NAFAVASDVMTLGGRLTDEATLKRVEILRTL 259
EAQ91749-Ab             ATLIFASLDCLDPTVNTGARVKVYFHTSSNAFAVASDVMTLGGRLTDEATLKRVEILRTL 281
EAQ91749-Pf             ATLIFASLDCLDPTVNTGARVKVYFHTSSNAFAVASDVMTLGGRLTDEATLKRVEILRTL 281
EAQ91749-Emericella     ------DLDCLDPTVNTGARVKVYFHTSSNAFAVASDVMTLGGRLTDEATLKRVEILRTL 296
EAQ91749-Penicillium    ------DLDCLDPTVNTGARVKVYFHTSSNAFAVASDVMTLGGRLTDEATLKRVEILRTL 296
TdiB-An                 AMLPLVGIDCLDPRTHKNARVKCYLHTSSNSFAVVRDVLTLGGRLSDDTSLKRVETLKSV 276
AstPT-At                PRLMLVGMDCGEPRD---SRLKIYLVTTKNSWATVQDVMTLGGRLDDEPTRKQLALLRKI 288
                                                     *::*.. **:****** *: : *::  *:.:

EAQ91749-Broad          WPLLRNEKPGQGPDPSDGDAYDAWEKPERITGTPLSGLQYNVEINPSKPGLEMKCYVPLF 319
EAQ91749-Ab             WPLLRNEKPGQGPDPSDGDAYDAWEKPERITGTPLSGLQYNVEINPSKPGLEMKCYVPLF 341
EAQ91749-Pf             WPLLRNEKPGQGPDPSDGDAYDAWEKPERITGTPLSGLQYNVEINPSKPGLEMKCYVPLF 341
EAQ91749-Emericella     WPLLRNEKPGQGPDPSDGDAYDAWEKPERITGTPLSGLQYNVEINPSKPGLEMKCYVPLF 356
EAQ91749-Penicillium    WPLLRNEKPGQGPDPSDGDAYDAWEKPERITGTPLSGLQYNVEINPSKPGLEMKCYVPLF 356
TdiB-An                 WPLLINELEGPQS--DAATMDESWSKPERLNRTGYSGIQYTIEITPGQAIPDTKIYVPLF 334
AstPT-At                WPYLINEPDN------TRIADENWCKPERMPRVGFFGLMYSLEIKPGRPTPEVKLYVPLF 342
                        ** * **              : * ****:  .   *: *.:**.*.:   : * *****

EAQ91749-Broad          QHNATAQESEGNVEKILTKLQHEWGSNGKYPEAVKAAHGQ-NRVSPTFVSFSYSKSKGPY 378
EAQ91749-Ab             QHNATAQESEGNVEKILTKLQHEWGSNGKYPEAVKAAHGQ-NRVSPTFVSFSYSKSKGPY 400
EAQ91749-Pf             QHNATAQESEGNVEKILTKLQHEWGSNGKYPEAVKAAHGQ-NRVSPTFVSFSYSKSKGPY 400
EAQ91749-Emericella     QHNATAQESEGNVEKILTKLQHEWGSNGKYPEAVKAAHGQ-NRVSPTFVSFSYSKSKGPY 415
EAQ91749-Penicillium    QHNATAQESEGNVEKILTKLQHEWGSNGKYPEAVKAAHGQ-NRVSPTFVSFSYSKSKGPY 415
TdiB-An                 QYTDSSEVAERNFESALKKLGNEWGLSGKYRSVMQEIFKDVENYGQTYASFSYTEGKGVY 394
AstPT-At                QYAESWAIAENNMETVLKLLDIDWGHSGKYRQAMEMTFGKGNSYGQIFVAYSYSERTGGY 402
                        *:  :   :* *.*. *. *  :** .*** ..::  . . :  .  :.::**:: .* *

EAQ91749-Broad          MSSYLPG-ILDVGAEMKAGNWKYT-   401
EAQ91749-Ab             MSSYLPG-ILDVGAEMKAGNWKYT-   417
EAQ91749-Pf             MSSYLPG-ILDVGAEMKA-------   423
EAQ91749-Emericella     MSSYLPG-ILDVGAEMKA-------   438
EAQ91749-Penicillium    MSSYLPG-ILDVGAEMKAGNWKYT-   432
TdiB-An                 TTSYVAMPIKDEGGGSLAGDFGFRN   419
AstPT-At                INSYVSMPVKDVPAHAFTGDYV---   424
                         .**:   : *  .   :
```

Abbildung 3-29: CLUSTAL O (1.2.1) Multi-Proteinsequenzvergleich zur Exonvorhersage von EAQ91749. EAQ91749-Broad: vorhergesagte Sequenz des Broad Institute (Accession No. EAQ91749). EAQ91749-Ab: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Alternaria brassicicola*. EAQ91749-Pf: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Penicillium funiculosum*. EAQ91749-Emericella: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Emericella*. EAQ91749-Penicillium: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Penicillium*. TdiB-An: Accession No. ABU51603. AstPT-At: Accession No. EAU29429. Markiert ist der lückenhafte Bereich im zweiten Exon der Sequenz des Broad Institute und die entsprechenden Bereiche der übrigen Sequenzen.

wahrscheinlich. Damit verbleiben zwei mögliche Varianten des zweiten Exons mit 453 bzw. 498 bp. Ein Multi-Proteinsequenzvergleich mit TdiB und AstPT zeigte, dass ein längeres zweites Exon durchaus wahrscheinlich sein könnte, da dieses zu einer höheren Übereinstimmung der Sequenzen führen würde (Abbildung 3-29). Das resultierende Protein würde damit aus 423 bzw. 438 Aminosäuren bestehen (Tabelle 3-19). Vergleicht man dies mit den Längen von TdiB (419 AS), AstPT (424 AS) und EAU39348 (424 AS), wird ersichtlich, dass die bisherige Sequenz von EAQ91749 mit 401 Aminosäuren möglicherweise fehlerhaft ist. Die Expressionsversuche sollten in Zukunft mit längeren Sequenzen durchgeführt werden.

Tabelle 3-19: Vergleich der vorhergesagten Exonlängen für *CHGG_03684* (FGENESH 2.6).

Sequenz	Exon 1 (Länge, bp)	Exon 2 (Länge, bp)	Exon 3 (Länge, bp)	Protein (AS)	Identität zu TdiB [%]
EAQ91749-Broad	1 – 683 (683)	840 – 1226 (387)	1278 – 1413 (136)	401	40
EAQ91749-Ab	1 – 683 (683)	729 – 1226 (498)	1278 – 1413 (136)	438	45
EAQ91749-Pf	1 – 683 (683)	729 – 1226 (498)	1278 – 1393 (116)	432	46
EAQ91749-Emericella	1 – 683 (683)	774 – 1226 (453)	1278 – 1393 (116)	417	44
EAQ91749-Penicillium	1 – 683 (683)	774 – 1226 (453)	1278 – 1413 (136)	423	43

EAQ91749-Broad: vorhergesagte Sequenz des *Broad Institute* (Accession No. EAQ91749).
EAQ91749-Ab: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Alternaria brassicicola*.
EAQ91749-Pf: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Penicillium funiculosum*.
EAQ91749-Emericella: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Emericella*.
EAQ91749-Penicillium: FGENESH 2.6 Vorhersage mit Parametern für *Penicillium*.

3.2. Untersuchungen zu putativen, nichtribosomalen Peptidsynthetase-ähnlichen Enzymen aus *Aspergillus terreus* und *Chaetomium globosum*

3.2.1. Einleitung

Neben den beiden bereits erwähnten Homologen der Bisindolylbenzochinon-synthetase TdiA in *A. terreus* und *C. globosum* (Abbildung 3-1) konnten fünf weitere Gene identifiziert werden, die für putative, NRPS-ähnliche Enzyme codieren. EAU39346 und EAQ91752 weisen dabei mit je 68% die höchsten Identitäten auf, während jene der anderen Homologen zwischen 38 und 42% liegen (Tabelle 3-20). Untereinander weisen die Proteine Identitäten zwischen 35 und 69% auf Aminosäureebene auf. Während *ATEG_00700* und *CHGG_03687* in einem fast vollständigen *tdi*-Cluster wiederzufinden sind, was für eine Beteiligung in der Biosynthese von Bisindolylbenzochinonen spricht, liegen die übrigen *tdiA*-Homologen nicht in erkennbaren Biosyntheseclustern vor. Allerdings besitzen alle Homologen die bereits von TdiA bekannte Struktur aus einem Modul mit drei Domänen, nämlich den Adenylierungs-, Thiolierungs- und Thioesterasedomänen (A-T-TE-Domänen). Im Gegensatz zu den echten NRPS besitzen sie keine Kondensationsdomäne (C-Domäne), was Aminosäuren als Substrate ausschließt. Viel wahrscheinlicher akzeptieren sie α-Ketosäuren als Substrate. *ATEG_00700*, *ATEG_02815*, *ATEG_02004* und *ATEG_03563* wurden parallel zu der vorliegenden Arbeit untersucht und in *A. terreus* ausgeschaltet (Guo

et al., 2013). Dabei konnte für *ATEG_00700* (*atqA*) eine Beteiligung in der Biosynthese von Asterrichinon CT5 nachgewiesen werden. *ATEG_02004* (*apvA*) und *ATEG_02815* (*btyA*) scheinen das Grundgerüst für Aspulvinone bzw. Butyrolaktone zu bilden. *ATEG_03563* (*atmelA*) wurde mit der Melaninproduktion in Verbindung gebracht, jedoch ohne Nachweis eines direkten enzymatischen Produktes.

Tabelle 3-20: Sequenzähnlichkeiten auf Aminosäureebene der putativen, NRPS-ähnlichen Proteine mit TdiA und untereinander.

Protein (Gen)	TdiA	EAU39346	EAU36966	EAU36089	EAU36837	EAU31031	EAQ90367
EAU39346 (*ATEG_00700*)	68						
EAU36966 (*ATEG_02004*)	42	43					
EAU36089 (*ATEG_02815*)	38	40	41				
EAU36837 (*ATEG_03563*)	38	35	59	37			
EAU31031 (*ATEG_08899*)	39	39	47	39	42		
EAQ90367 (*CHGG_02302*)	38	39	42	38	38	36	
EAQ91752 (*CHGG_03687*)	68	69	42	40	37	39	38

Die Zahl der identischen Aminosäuren ist in Prozent angegeben.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Sequenzen der sieben Gene zu amplifizieren, zu klonieren und zur Transformation von *A. niger* AB 1.13 zu verwenden. Dieser Stamm ist ein UV-induzierter, Protease-defizienter Mutant von *A. niger* AB 4.1 (Mattern *et al.,* 1992), der wiederum ein UV-induzierter, *cspA1 pyrG1*-Mutant von *A. niger* ATCC 9029 ist (van Hartingsveldt *et al.,* 1987). Mithilfe des Vektors pJW24, der *pyrG* aus *A. parasiticus* als Selektionsmarker enthält (Calvo *et al.,* 2004), sollen die Gene in *A. niger* AB 1.13 eingebracht und deren Funktion untersucht werden. Dabei findet eine ektopische, also zufällige, Integration der gesamten transformierten DNA statt, so dass die Transformanten im Anschluss uridinprototroph sind und gegenüber untransformierten Pilzen auf uridinfreiem Medium selektiert werden können. Da pJW24 keine zusätzlichen regulatorischen Elemente enthält, sollten die Promotor- und Terminatorsequenzen der jeweiligen Gene ebenfalls amplifiziert werden. Da diese Sequenzen in Ascomyceten nicht bekannt sind, sollten pauschal etwa 500 bp je Promotor und Terminator, maximal jedoch die Entfernung bis zum nächsten ORF, zusätzlich mitamplifiziert werden (Tabelle 3-21).

Tabelle 3-21: Übersicht über die zu amplifizierenden Sequenzen.

Gen	Promotor [bp]	Gen [bp]	Terminator [bp]	Gesamt [bp]
ATEG_00700	521	2889	438	3848
ATEG_02004	506	2779	163	3448
ATEG_02815	351	2914	448	3713
ATEG_03563	511	2779	496	3786
ATEG_08899	466	2841	482	3789
CHGG_02302	378	2964	488	3830
CHGG_03687	561	2874	424	3859

Durch bisherige Untersuchungen zu NRPS konnten zehn Aminosäuren identifiziert werden, die mit der Substratbindung im aktiven Zentrum in Verbindung gebracht werden und aus denen Schlüsse auf die Substratspezifität gezogen werden können (Conti *et al.,* 1997; Stachelhaus *et al.,* 1999). Mithilfe des NRPSpredictor2 (Röttig *et al.,* 2011) können die A-Domänen und der NRPS-Code aus Aminosäuresequenzen extrahiert und Vorhersagen zu den möglichen Substraten erhalten werden (Tabelle 3-22). So scheinen die ersten drei Positionen des NRPS-Codes V-A-E/H, wie für TdiA zu finden, mit der Aktivierung von aromatischen α-Ketosäuren zu korrelieren (Kalb *et al.,* 2013). Für die analysierten sieben TdiA-Homologen aus *A. terreus* und *C. globosum* konnte an diesen Positionen kein genau übereinstimmendes Motiv gefunden werden. Allerdings beruht dieses Modell größtenteils auf Daten bakterieller Enzyme, sodass die Vorhersagen für pilzliche Enzyme mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind. So konnten für EAU39346 und EAQ91752 keine Ergebnisse erhalten werden, aber auch in TdiA wurde keine A-Domäne erkannt. Ein Multiprotein-sequenzvergleich mit diesen Enzymen und GrsA (Gramicidinsynthetase 1) (Krätzschmar *et al.,* 1989), dessen A-Domäne PheA die Basis für die Vorhersagen ist, zeigte, dass Valin als erste Aminosäure in allen Homologen und TdiA (außer in EAU36089) zu finden ist (s. Anhang 6.6). Auch der Lysinrest entsprechend der Position 517 ist im Sequenzvergleich bei allen Proteinen außer in EAU36837 zu finden. Die Abwesenheit der Aminosäure Glycin an den Positionen 1 und 8 des NRPS-Codes spricht zumindest gegen eine Aktivierung von Anthranilsäure (Ames & Walsh 2010). Die wahrscheinlichsten Substrate sind folglich aromatische α-Ketosäuren.

Tabelle 3-22: Vorhersagen der NRPS-Codes mit NRPSpredictor2 (nrps.informatik.uni-tuebingen.de).

Enzym	**NRPS-CODE (Position/Aminosäure[1])**									
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**
	235	**236**	**239**	**278**	**299**	**301**	**322**	**330**	**331**	**517**
PheA	D	A	W	T	I	A	A	I	C	K
TdiA[2]	V	A	H	F	T	G	A	A	C	K
EAU39346[3]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EAU36966	V	A	V	F	A	G	G	A	G	-
EAU36089	I	A	A	F	L	G	A	A	G	-
EAU36837	V	A	I	F	A	G	G	A	G	-
EAU31031	E	V	F	F	V	G	A	A	G	-
EAQ90367	V	A	V	F	A	G	G	A	G	-
EAQ91752[3]	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[1]: Die Nummerierung bezieht sich auf PheA (A-Domäne von GrsA, CAA33603.1 aus *Bacillus brevis*).
[2]: (nach Kalb *et al.,* 2013)
[3]: keine A-Domäne entdeckt.

3.2.2. Amplifikation und Klonierung von *ATEG_02004*, *ATEG_03563* und *ATEG_08899* aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958

Die Gene *ATEG_02004*, *ATEG_03563* und *ATEG_08899* wurden jeweils aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958 amplifiziert. Dabei wurden jeweils die Primerpaare ATEG_02004_for und ATEG_02004_rev, ATEG_03563_for und ATEG_03563_rev und ATEG_08899_for sowie ATEG_08899_rev verwendet. In vorausgegangenen Gradienten-PCR-Versuchen konnte die optimale Anlagerungstemperatur für die Primerpaare jeweils bei 50 °C bestimmt werden. Daraufhin wurden die Gensequenzen mit benachbarten Promotor- und Terminatorbereichen mithilfe der *High Fidelity* Polymerase amplifiziert. Abbildung 3-30 zeigt die erfolgreiche Amplifikation der Gensequenzen.

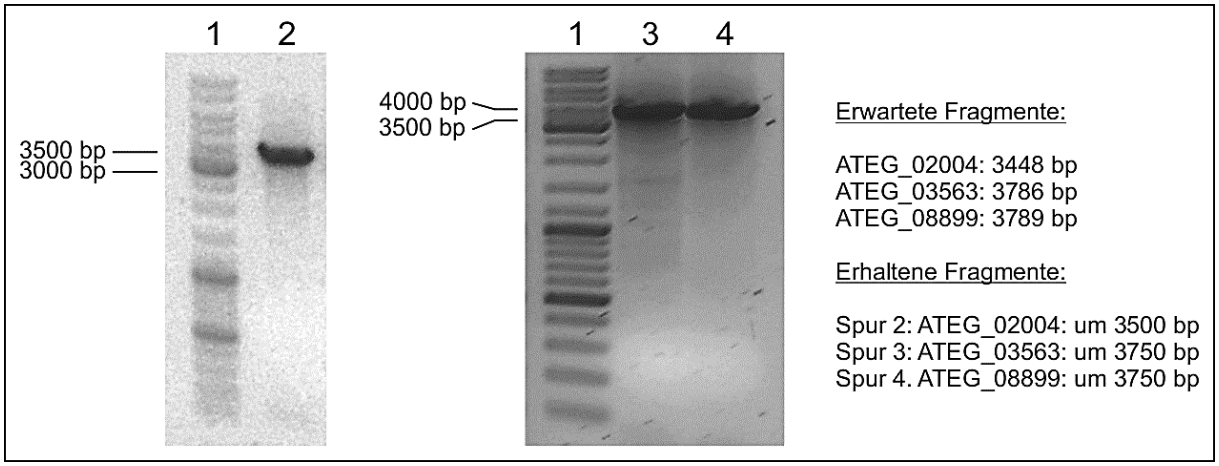


Abbildung 3-30: Agarosegele der PCR-Amplifikationen von *tdiA*-Homologen aus gDNA von *A. terreus* DSM 1958. Die Elektrophorese wurde in 0,8%igen Gelen durchgeführt. Spur 1: jeweils DNA-Größenstandard. Spur 2: PCR-Produkt für *ATEG_02004*. Spur 3: PCR-Produkt für *ATEG_03563*. Spur 4: PCR-Produkt für *ATEG_08899*.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden jeweils mittels TA-Klonierung in den Vektor pGEM®-T easy ligiert und durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ eingebracht. Die Kolonien wurden durch Blau-Weiß-Screening vorselektiert, ihre Plasmide aufgereinigt und mittels Restriktion untersucht. pST32, pST30 und pST31 zeigten in Kontrollverdauen mit EcoRI (Abbildung 3-31, Spur 2), XbaI (Abbildung 3-32, Spur 3) und BamHI (Abbildung 3-33, Spur 2) jeweils das erwartete Restriktionsmuster. Die erfolgreiche Ligation der Sequenzen konnte zusätzlich durch teilweises Sequenzieren von beiden Seiten der Inserts bestätigt werden.

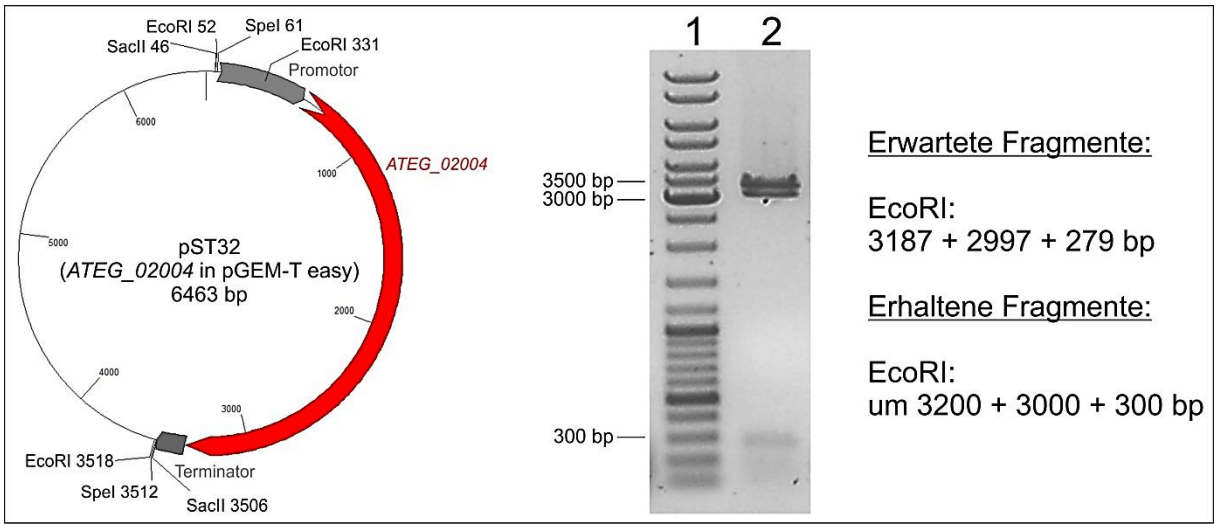


Abbildung 3-31: Vektorkarte von pST32 (*ATEG_02004* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. EcoRI diente der Restriktionskontrolle, SpeI und SacII wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: EcoRI-verd EcoRI-verdautes pST32.

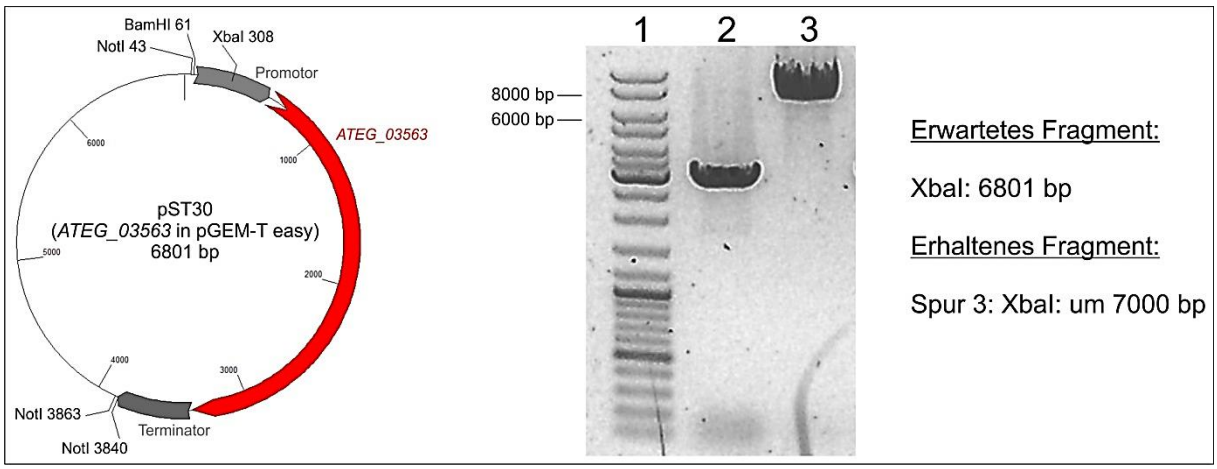


Abbildung 3-32: Vektorkarte von pST30 (*ATEG_03563* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. XbaI diente der Restriktionskontrolle, BamHI und NotI wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: Xba-verdauter Leervektor pGEM-T® easy. Spur 3: XbaI-verdautes pST30.

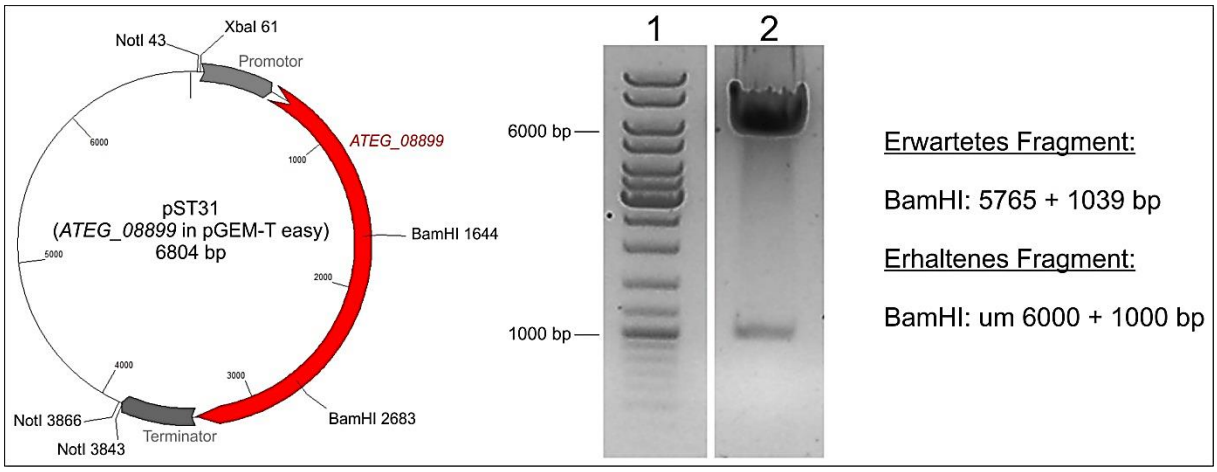


Abbildung 3-33: Vektorkarte von pST31 (*ATEG_08899* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. BamHI diente der Restriktionskontrolle, XbaI und NotI wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: BamHI-verdautes pST31.

Daraufhin wurden die pGEM-T® easy-Konstrukte mit pJW24 (Abbildung 3-34) jeweils einem Doppelverdau unterzogen, pJW24 wurde zusätzlich mit SAP verdaut, um Religate möglichst auszuschließen. Die erhaltenen Fragmente wurden durch eine Agarose-Gelelektrophorese getrennt, aufgereinigt und miteinander ligiert. Im Falle von pST32 wurden SpeI und SacII verwendet, die Fragmente bestanden aus 3445 bp für *ATEG_02004* und 5943 bp für pJW24. BamHI und NotI lieferten mit pST30 3779 bp für *ATEG_03563* und 5949 bp für pJW24. XbaI und NotI ergaben mit pST31 3782 bp für *ATEG_08899* und 5961 bp für pJW24. Nach Transformation in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ und Isolierung der Plasmide konnten für *ATEG_02004* (Abbildung 3-35) und *ATEG_03563* (Abbildung 3-36) Konstrukte erhalten werden, die das erwartete Restriktionsmuster aufwiesen. Diese Konstrukte, pST38 für *ATEG_02004* und pST33 für *ATEG_03563* wurden nachfolgend für die Transformation von *A. niger* AB 1.13 genutzt.

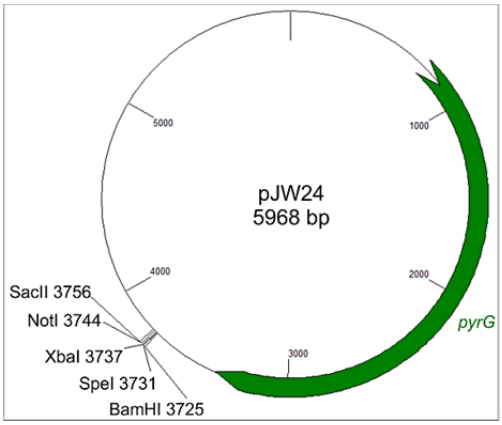


Abbildung 3-34: Vektorkarte von pJW24. Angegeben sind die für die Umklonierung relevanten Restriktionsschnittstellen.

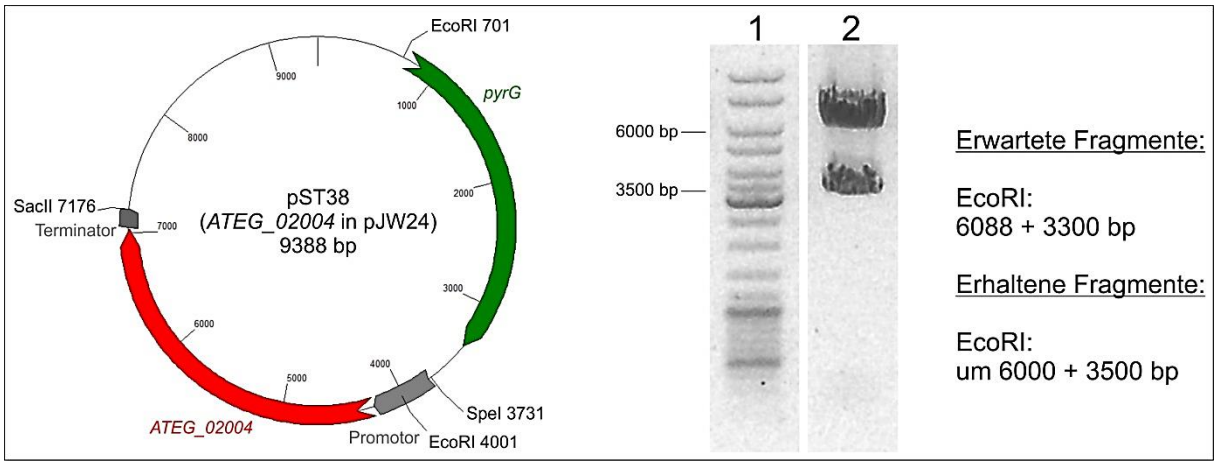


Abbildung 3-35: Vektorkarte von pST38 (*ATEG_02004* in pJW24) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. EcoRI diente der Restriktionskontrolle, SpeI und SacII wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: EcoRI-verdautes pST38.

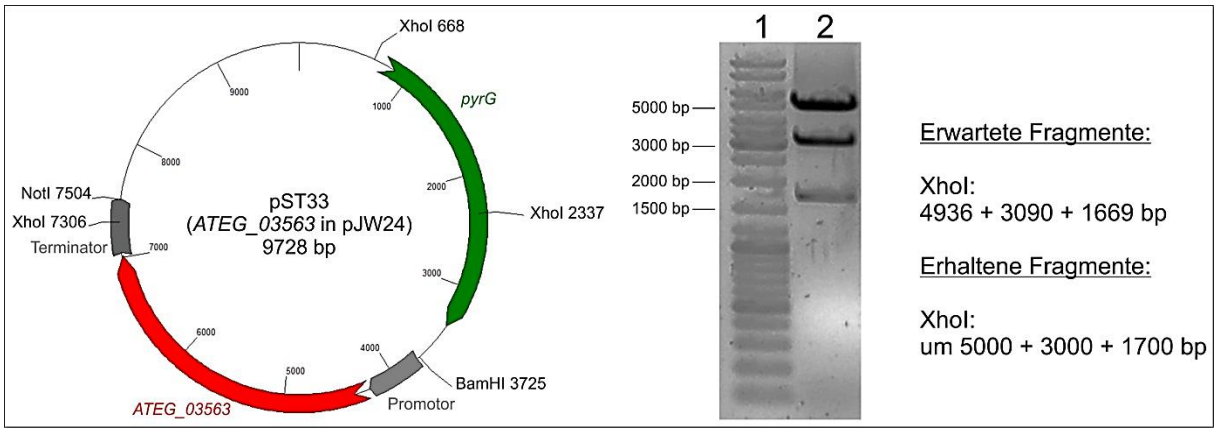


Abbildung 3-36: Vektorkarte von pST33 (*ATEG_03563* in pJW24) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. XhoI diente der Restriktionskontrolle, BamHI und NotI wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: XhoI-verdautes pST33.

3.2.3. Amplifikation und Klonierung von *CHGG_03687* aus gDNA von *C. globosum* DSM 62110 und NRRL 1870

CHGG_03687 konnte aus gDNA von zwei verschiedenen Stämmen von *C. globosum* amplifiziert werden, nämlich von DSM 62110 und NRRL 1870. Da diese beiden Stämme nicht sequenziert waren, stand nicht fest, ob beide Sequenzen identisch sein würden. Als Primer wurden CHGG_03687_for und CHGG_03687_rev bei einer Anlagerungstemperatur von 59 °C verwendet. Die Gensequenzen wurden samt benachbarter Promotor- und Terminatorbereiche mithilfe der *High Fidelity* Polymerase amplifiziert. Abbildung 3-37 zeigt die erfolgreiche Amplifikation der Gensequenzen.

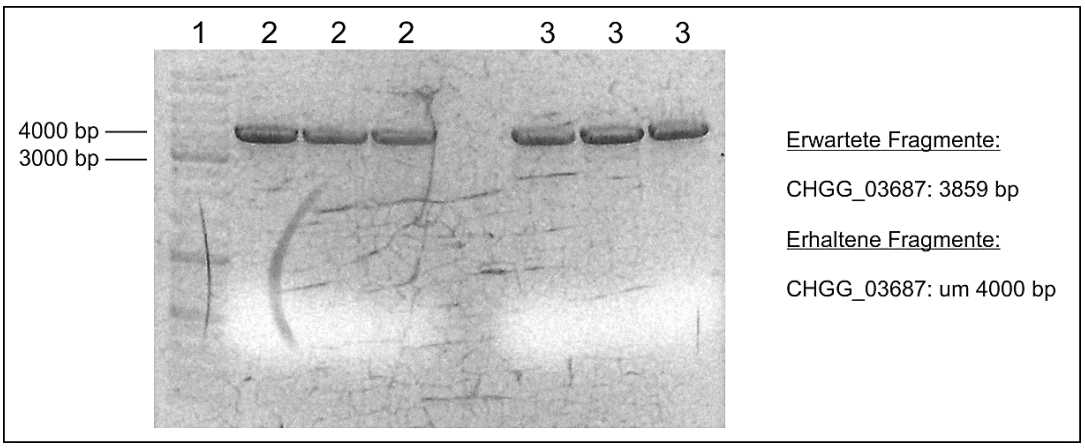


Abbildung 3-37: Agarosegel der PCR-Amplifikationen von *CHGG_03687* aus gDNA von *C. globosum*. Die Elektrophorese wurde im 0,8%igen Gel durchgeführt. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: PCR-Produkte für *CHGG_03687* aus gDNA von *C. globosum* NRRL 1870. Spur 3: PCR-Produkte für *CHGG_03687* aus gDNA von *C. globosum* DSM 62110.

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden jeweils mittels TA-Klonierung in den Vektor pGEM®-T easy ligiert und durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ eingebracht. Die Kolonien wurden durch Blau-Weiß-Screening vorselektiert, ihre Plasmide aufgereinigt und mittels Restriktion untersucht. pST26 (*CHGG_03687* aus gDNA von *C. globosum* NRRL 1870) und pST27 (*CHGG_03687* aus gDNA von *C. globosum* DSM 62110) zeigten in Kontrollverdauen mit EcoRI (Abbildung 3-38) jeweils das erwartete Restriktionsmuster. Die erfolgreiche Ligation der Sequenzen wurde zusätzlich durch teilweises Sequenzieren von beiden Seiten der Inserts in beiden Plasmiden bestätigt. Dabei waren jeweils etwa die ersten 280 bp und die letzten 430 bp der Gensequenzen in pST26 und pST27 identisch. Ob auch die übrigen, durch die Sequenzierung nicht erfassten ca. 2160 bp übereinstimmten, ist nicht bekannt. Allerdings konnten auch die genomischen Sequenzen der putativen PTase des Clusters (*CHGG_03684*) aus beiden Stämmen amplifiziert, kloniert und sequenziert werden. Hier gab es keine Unterschiede zwischen *CHGG_03684* aus *C. globosum* NRRL 1870 (in pST7) und *CHGG_03684* aus *C. globosum* DSM 62110 (in pST8).

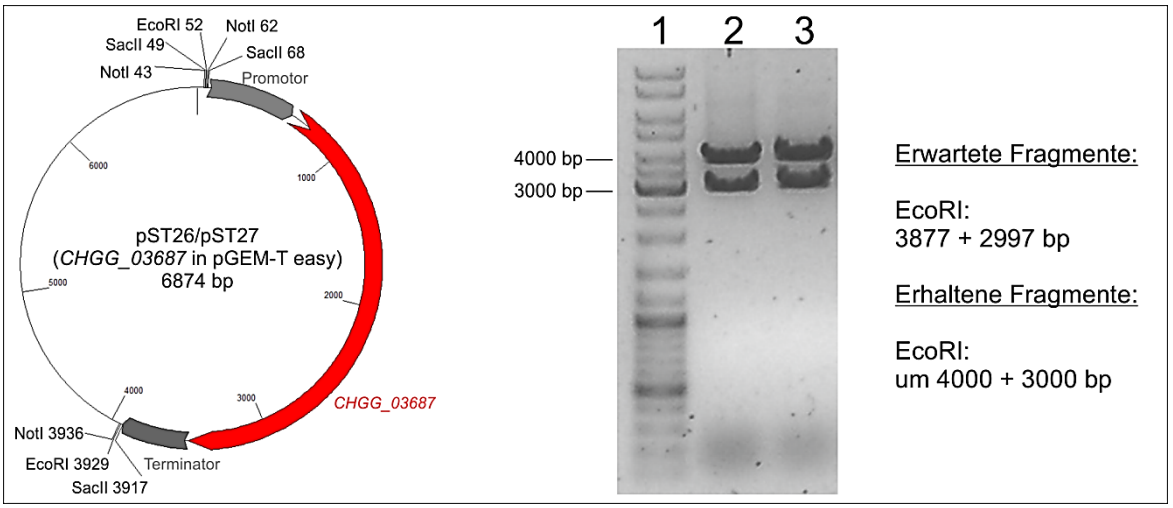


Abbildung 3-38: Vektorkarte von pST26 bzw. pST27 (*CHGG_03687* in pGEM®-T easy) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. EcoRI diente der Restriktionskontrolle, NotI und SacII wurden zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: EcoRI-verdautes pST26. Spur 3: EcoRI-verdautes pST27.

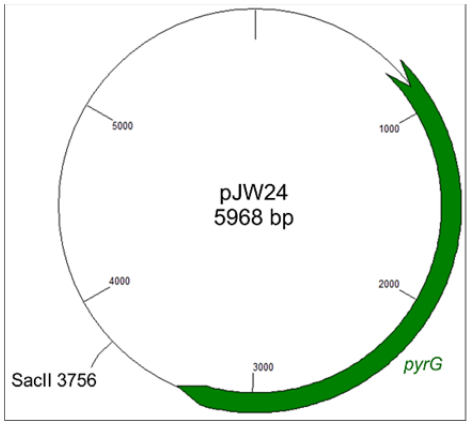


Abbildung 3-39: Vektorkarte von pJW24. Angegeben ist die für die Umklonierung relevante Restriktionsschnittstelle.

Durch die Einführung der NotI-Schnittstelle durch den Primer CHGG_03687_for wurde ebenfalls zufällig eine Schnittstelle für SacII eingeführt. Daher wurde in den anschließenden Klonierungsarbeiten ausschließlich SacII verwendet. Die Plasmide pST26 und pST27 sowie pJW24 (Abbildung 3-39) wurden mit SacII verdaut. Um Religate von pJW24 zu verhindert, wurde dieser zusätzlich mit SAP dephosphoryliert. Mittels Agarose-Gelelektrophorese wurden die erhaltenen Fragmente aufgereinigt, 3849 bp für *CHGG_03687* und 5968 bp für pJW24, miteinander ligiert und die Ansätze durch Hitzeschock in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ eingebracht. Für die aus *C. globosum* NRRL 1870 amplifizierte Sequenz konnte mit pST28 ein Plasmid erhalten werden, das das erwartete Restriktionsmuster aufwies und in nachfolgenden Transformationsversuchen eingesetzt werden konnte (Abbildung 3-40).

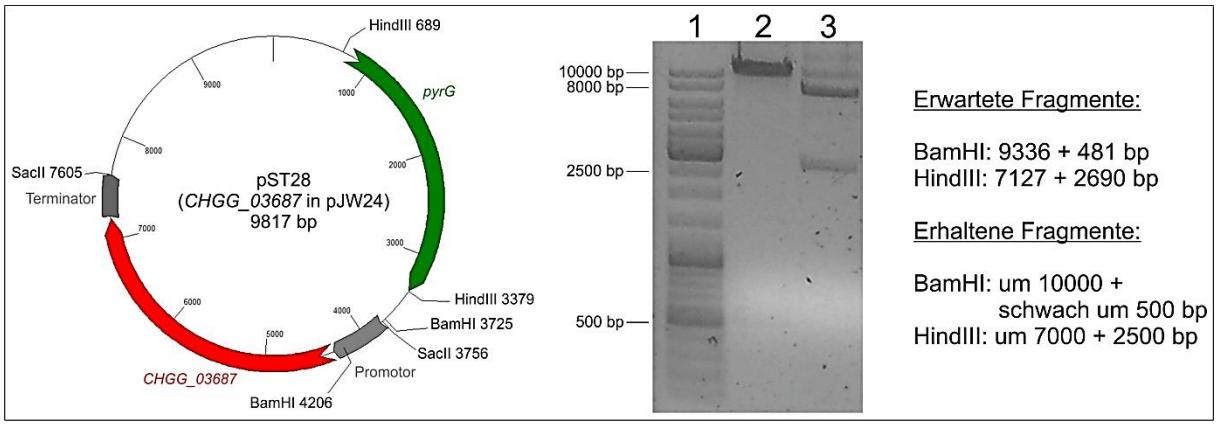


Abbildung 3-40: Vektorkarte von pST28 (*CHGG_03687* in pJW24) und 0,8%iges Agarosegel zur Überprüfung des Restriktionsmusters. BamHI und HindIII dienten der Restriktionskontrolle, SacII wurde zur Umklonierung verwendet. Spur 1: DNA-Größenstandard. Spur 2: BamHI-verdautes pST28. Spur 3: HindIII-verdautes pST28.

3.2.4. Amplifikationsversuche von *ATEG_00700*, *ATEG_02815* und *CHGG_02302*

Neben den bereits amplifizierten *tdiA*-Homologen sollten auch *ATEG_00700* und *ATEG_02815* aus *A. terreus* und *CHGG_02302* aus *C. globosum* amplifiziert werden. Dazu wurden die Primerpaare ATEG_00700_for und ATEG_00700_rev, ATEG_02815_for und ATEG_02815_rev und CHGG_02302_for und CHGG_02302_rev verwendet. Jeder Primer sollte dabei je eine Schnittstelle einführen, die in anschließenden Arbeiten zur Umklonierung der Sequenzen in den Vektor pJW24 genutzt werden sollte. Für die Amplifikation von *ATEG_00700* und *ATEG_02815* wurde gDNA von *A. terreus* DSM 1958 verwendet. Die Amplifikation von *CHGG_03687* wurde mit gDNA von *C. globosum* DSM 1962, DSM 62110 und NRRL 1870 getestet. Es wurden Gradienten-PCR-Versuche mit Anlagerungstemperaturen von 66 bis 40 °C durchgeführt. Daneben wurde den PCR-Ansätzen DMSO zugegeben, was sich bereits bei der Amplifikation von *ATEG_00702* als erfolgreich erwiesen hatte. Allerdings konnte keine der drei Sequenzen unter verschiedenen Bedingungen amplifiziert werden.

3.2.5. Transformation von *A. niger* AB 1.13

Die erfolgreich klonierten Konstrukte pST28, pST33 und pST38 sollten im Folgenden zur Transformation von *A. niger* AB 1.13 genutzt werden. Dazu wurden die ausgekeimten Konidien von *A. niger* AB 1.13 nach 12 h Inkubation geerntet. Einige der Keimschläuche waren nach dieser Zeit bereits länger als die geforderten drei Konidiendurchmesser, während der Großteil der Konidien noch nicht ausgekeimt war (Abbildung 3-41, A). Aufgrund ihrer hydrophoben Oberfläche bildeten sie zahlreiche Aggregate. Dennoch waren ausreichend geeignete Keimschläuche vorhanden, die anschließend mit *lysing enzyme* aus

Trichoderma harzianum versetzt wurden. Der Verlauf der Protoplastierung wurde in regelmäßigen Abständen mikroskopisch verfolgt. Nach vierstündiger Inkubation bei 28 °C und 80 rpm waren ausreichend Protoplasten sichtbar (Abbildung 3-41, B, Pfeil). Sie sind leicht von verbliebenen Konidien zu unterscheiden, da sie größer und heller erscheinen und aufgrund ihrer geringeren Dichte über den Konidien schwimmen. Die Protoplasten wurden geerntet und mit den vorhandenen Plasmiden transformiert.

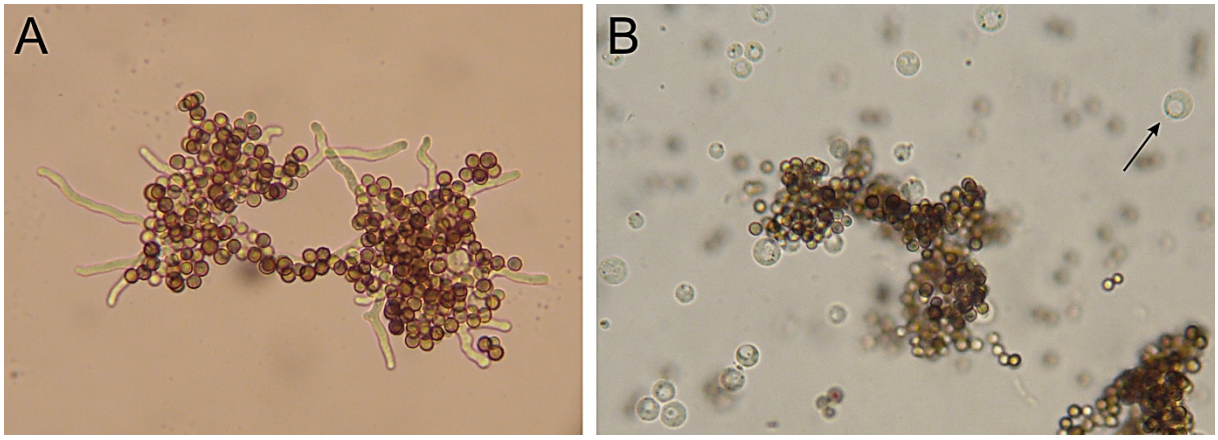


Abbildung 3-41: Mikroskopische Aufnahmen der Kontrolle des Protoplastierungsfortschritts. A: Ausgekeimte Konidien vor Beginn der Protoplastierung. B: Nach 4 h Behandlung mit *lysing enzyme* sind die Protoplasten deutlich zu erkennen (Pfeil).

Dabei konnte ein Protoplasten-Titer von $3{,}0\times10^{8}$/ml erreicht werden. Nach zwei bis vier Tagen Inkubation bei 30 °C unter Lichtausschluss waren lediglich im Fall von pST38 elf weiße Kolonien sichtbar. Zur weiteren Selektion wurden die Kolonien sobald sie nach ca. vier Tagen erste, schwarze Konidiosporen bildeten zweimal auf uridinfreies Selektionsmedium umgesetzt, um nur Sporen umzusetzen.

3.2.6. Kultivierung und Analyse der Transformanten

Um die nach Transformation von pST38 erhaltenen Kolonien auf die Integration von *ATEG_02004* in das Genom von *A. niger* AB 1.13 zu untersuchen, wurde gDNA der Transformanten isoliert. In einer PCR mit dem Primerpaar ATEG_02004_for und ATEG_02004_rev sollte das Vorhandensein der Sequenz nachgewiesen werden. Im Fall von *A. niger* war die Phenol-Chloroform-Methode (s. 2.5.3) die erfolgreichste zur Extraktion von genomischer DNA (Abbildung 3-42). Mithilfe der Taq-Polymerase konnten für drei Kolonien (Abbildung 3-43, K2, K3 und K4) Fragmente einer Größe um 3500 bp amplifiziert werden, was *ATEG_02004* mit einer Größe von 3448 bp entspricht. gDNA von *A. niger* AB 1.13 diente dabei als Negativkontrolle, das Plasmid pST32 (*ATEG_02004* in pGEM-T® easy) als Positivkontrolle.

Die identifizierten Transformanten wurden daraufhin in jeweils fünf Ansätzen in 100 ml GMM bei 30 °C und 140 rpm unter Lichtausschluss für 15 Tage kultiviert.

Anschließend wurden die Kulturfiltrate mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die organischen Phasen zur Trockne eingeengt. Die Extrakte wurden in Methanol aufgenommen (20 mg/ml) und mittels HPLC (Abbildung 3-44) und LC/MS untersucht. Allerdings waren hier für *A. niger* AB 1.13 als auch die Transformanten ST01, ST02 und ST03 dieselben Substanzen zu finden. Eine Masse von m/z = 297,0763 für $[M+H]^+$ für das vorhergesagte Produkt von EAU36966 (*ATEG_02004*), Aspulvinon E (Guo *et al.,* 2013), war nicht zu detektieren.

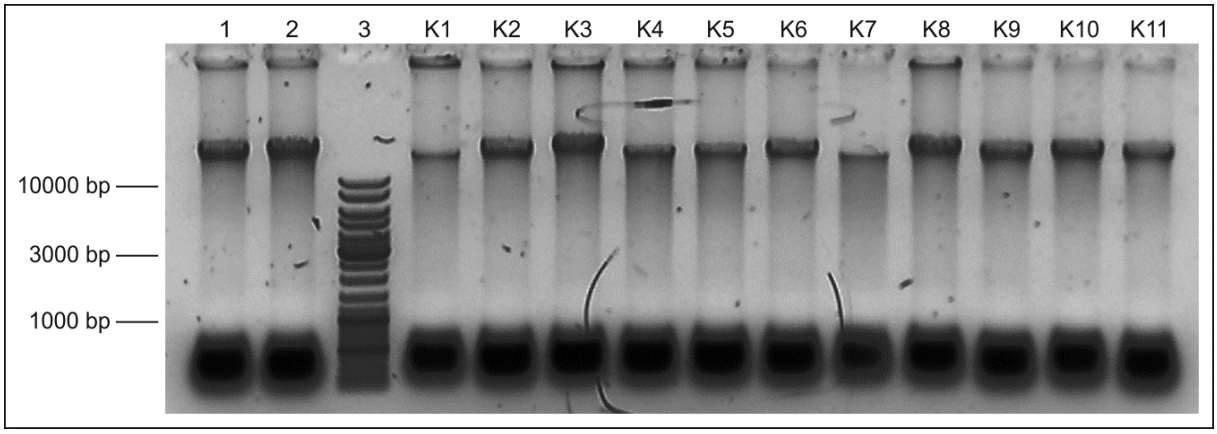


Abbildung 3-42: Agarosegel der Extraktionen von gDNA aus *A. niger* AB 1.13 (Spur 1 und 2) und Kolonien nach Transformation (K1-K11). 0,8%iges Agarosegel. Spur 3: DNA-Größenstandard.

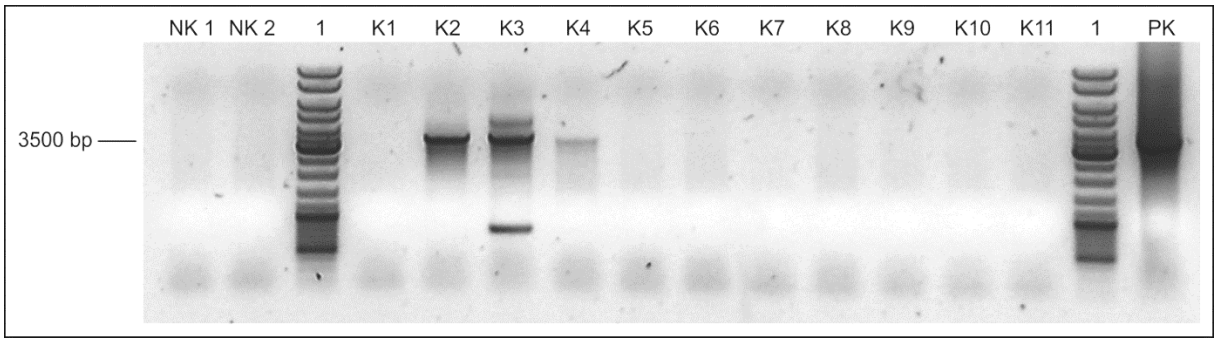


Abbildung 3-43: Agarosegel der PCR-Amplifikation von *ATEG_02004* zur Überprüfung der Integration ins Genom der erhaltenen Kolonien (K1-K11). 0,8%iges Agarosegel. Zur Amplifikation wurde das Primerpaar ATEG_02004_for und ATEG_02004_rev verwendet. Das daraus resultierende Produkt hat eine Größe von 3448 bp. Spur 1: DNA-Größenstandard. NK: Negativkontrollen mit gDNA von *A. niger* AB 1.13. PK: Positivkontrolle mit pST32 (*ATEG_02004* in pGEM-T® easy).

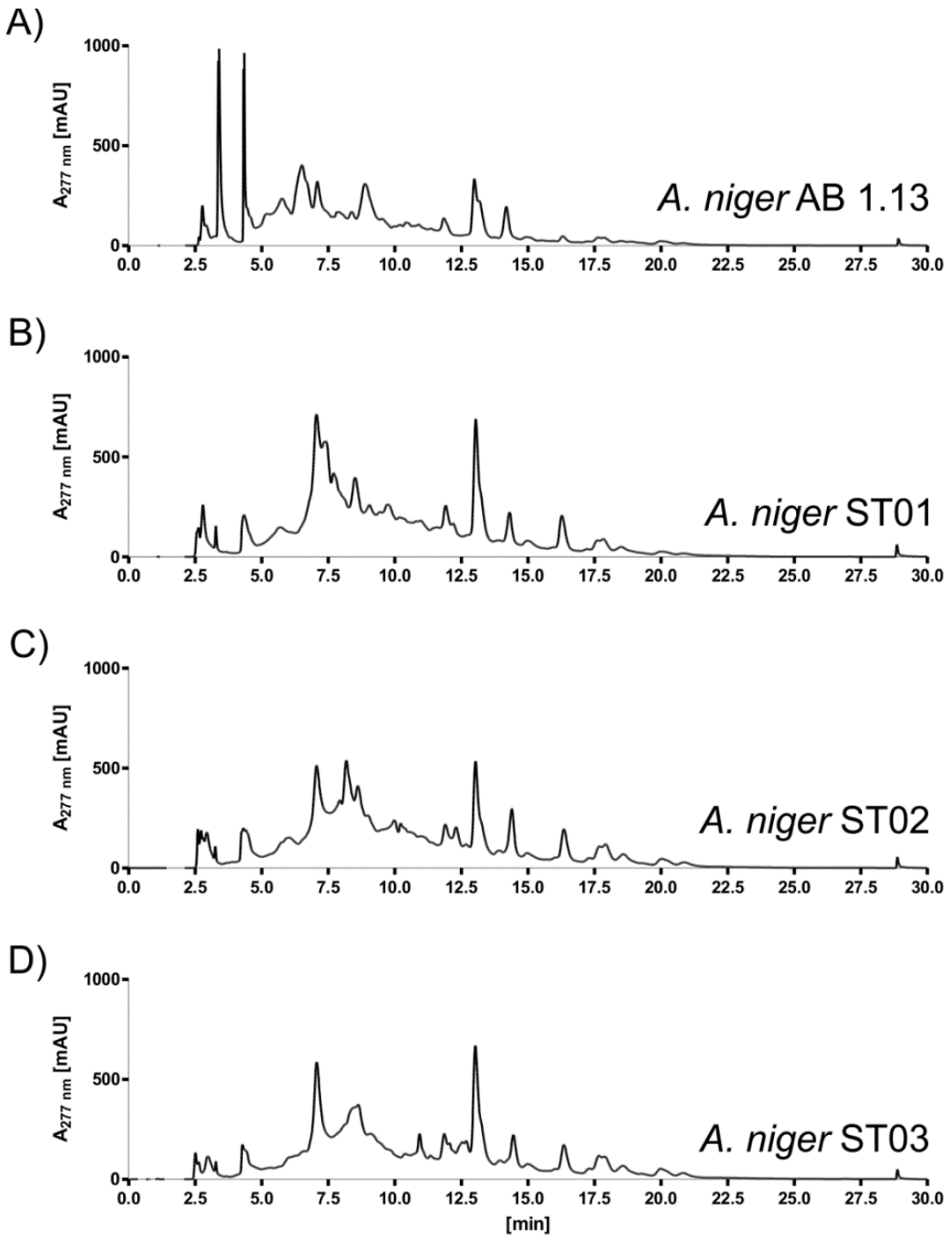


Abbildung 3-44: HPLC-Chromatogramme der Extrakte von *A. niger* AB 1.13 (A) und Transformanten *A. niger* ST01-ST03 (B-D). Die Kultivierung wurde bei 30 °C und 140 rpm für 15 Tage durchgeführt. Die Kulturfiltrate wurden mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die Extrakte in Methanol aufgenommen.

3.3. Zielgerichtete Mutagenese von Prenyltransferasen

3.3.1. Zielgerichtete Mutagenese von FtmPT1 zur Identifizierung der am Prenyltransfer beteiligten Aminosäuren

3.3.1.1. Einleitung

FtmPT1 gehört zur DMATS-Superfamilie und verantwortlich für die reguläre Prenylierung von Brevianamid F (*cyclo*-L-Trp-L-Pro) an Position C-2 (Abbildung 3-45) in der Biosynthese der Fumitremorgine in *A. fumigatus* (Grundmann & Li 2005). Die Prenylierung erhöht durch Einführung von lipophilen Strukturen die biologische Aktivität (Wollinsky *et al.,* 2012a). So konnte beispielsweise für Tryprostatin A und B eine starke Zytotoxizität nachgewiesen werden (Zhao *et al.,* 2002), für Fumitremorgin C eine Hemmung des Brustkrebs-Resistenz-Proteins (BCRP) (Rabindran *et al.,* 1998). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war innerhalb der Proteine der DMATS-Superfamilie nur die Kristallstruktur von FgaPT2, ebenfalls aus *A. fumigatus*, bekannt (Metzger *et al.,* 2009). Diese ist durch ein sogenanntes *prenyltransferase barrel* (*PT barrel*) charakterisiert, bestehend aus zehn anti-parallelen β-Faltblättern umgeben von α-Helices, die zum Lösungsmittel hin gerichtet sind. Im Inneren des β-Faltblatt-Zylinders befindet sich das katalytische Zentrum. FgaPT2 katalysiert in der Biosynthese von Ergotalkaloiden die reguläre Prenylierung von L-Tryptophan an Position C-4 (Unsöld & Li 2005).

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stehle (Tübingen) konnte für FtmPT1 eine ähnliche Struktur aus zehn antiparallelen β-Faltblättern und zehn α-Helices aufgeklärt werden (Jost *et al.,* 2010). Auch hier bilden die zu einem Zylinder angeordneten β-Faltblätter einen lösungsmittelgefüllten Raum für das katalytische Zentrum. Diese Struktur wird aus wiederholt angeordneten αββα-Abfolgen gebildet. Ähnliche Strukturen konnten bisher außer bei FgaPT2 nur bei CloQ und NphB beobachtet werden (Abbildung 3-46).

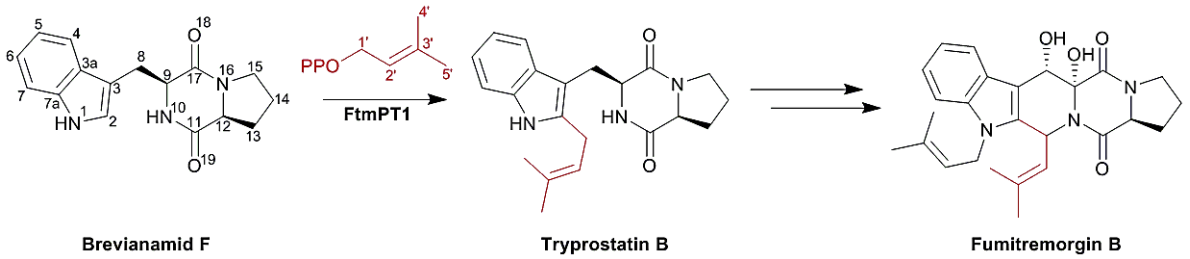


Abbildung 3-45: Durch FtmPT1 katalysierte Reaktion mit Brevianamid F (Jost *et al.,* 2010). Das enzymatische Produkt Tryprostatin B ist ein Vorläufer der Fumitremorgine wie z. B. Fumitremorgin B.

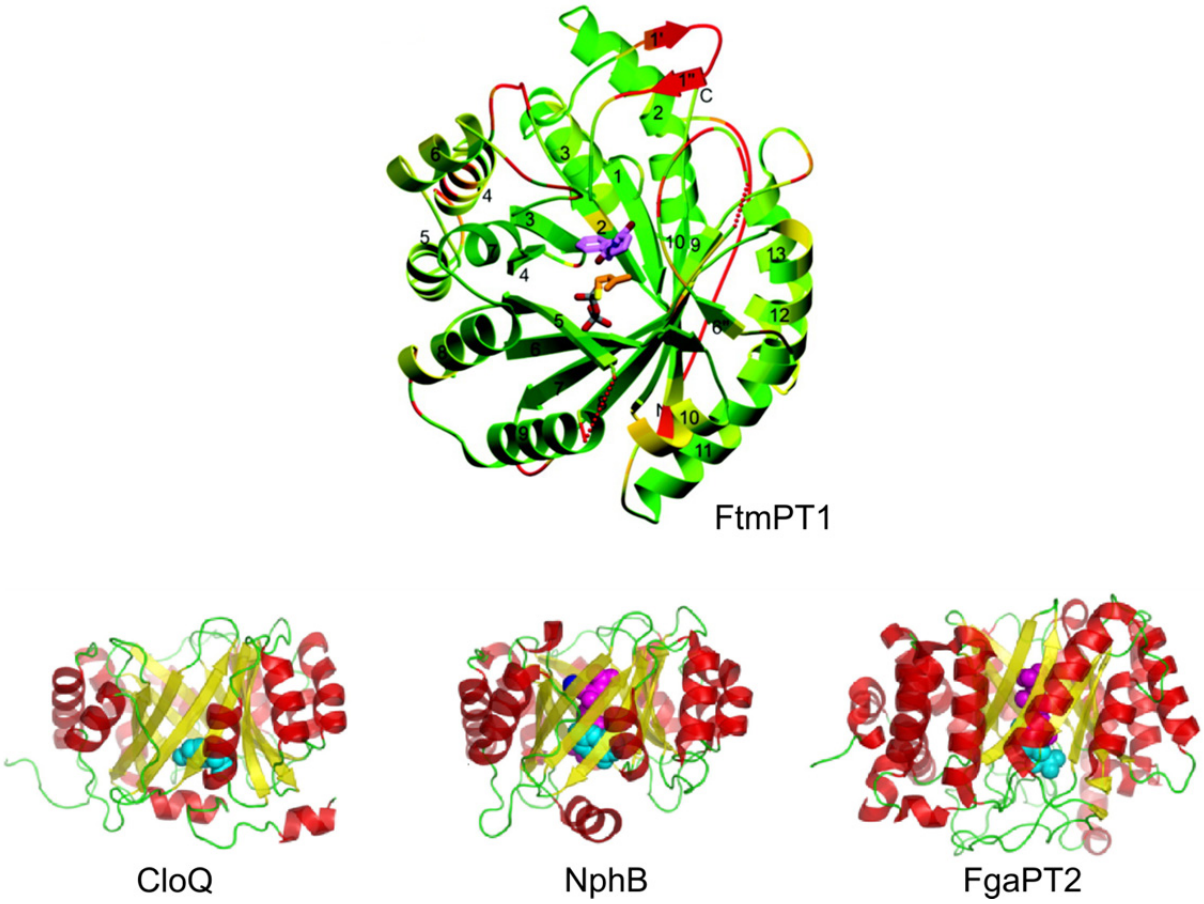


Abbildung 3-46: Struktureller Vergleich von FtmPT1 (Jost *et al.,* 2010) mit CloQ, NphB und FgaPT2 (Metzger *et al.,* 2010). Die Enzyme sind mit gebundenen Substraten dargestellt. Für CloQ, NphB und FgaPT2 sind die α-Helices rot und die β-Faltblätter gelb dargestellt.

FtmPT1 konnte mit dem aromatischen Substrat Brevianamid F und dem Substratanalogon DMSPP kokristallisiert werden und lieferte so Hinweise auf die während der Katalyse beteiligten Aminosäuren (Abbildung 3-47) (Jost *et al.,* 2010). Brevianamid F bindet nahe des Zentrums der zylindrischen *PT barrel*-Struktur. Der aromatische Indolring liegt im Bereich vieler hydrophober Bereiche und Aminosäuren (Y435, Y203, L96, L187, M94, M364 und F280), die an der Koordinierung beteiligt sein könnten. Das Stickstoffatom des Indolrings liegt in der Nähe der Carboxylgruppe von E102, einer Aminosäure, die in vielen Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie konserviert ist. O-18 in Brevianamid F könnte über direkte Wasserstoffbrücken durch Y205 koordiniert werden, während O-19 über ein Wassermolekül durch S92 und W182 stabilisiert werden könnte. Für N-10 wäre eine Verbindung über Wasserstoffbrücken zur Carbonylgruppe im Proteinrückgrat von M94 möglich.

Bisherige Mutageneseexperimente konnten bereits die essentielle Bedeutung der Aminosäuren K201 und K294 während der Katalyse aufzeigen (Stec *et al.,* 2008). Durch ihre basischen Eigenschaften sind sie in der Lage, den anionischen Diphosphatrest von DMSPP

zu stabilisieren. In der Kristallstruktur konnten diese beiden Aminosäuren in unmittelbarer Nähe zum Diphosphatrest von DMSPP wiedergefunden werden (Abbildung 3-48). Daneben wäre auch eine Stabilisierung durch R113, Q380 und Y446 möglich. Das erste Phosphoratom des Diphosphatrestes könnte durch die Hydroxylgruppen von Y203 und Y450 stabilisiert werden (Abbildung 3-47).

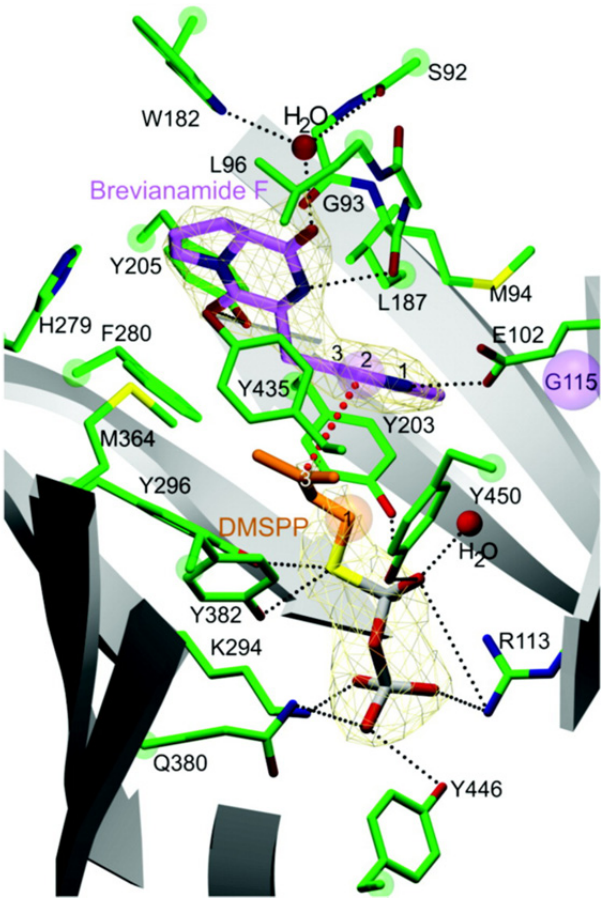


Abbildung 3-47: Aktives Zentrum von FtmPT1 mit gebundenen Substraten und nächsten Aminosäuren (Jost *et al.,* 2010). Brevianamid F (violett) und DMSPP (orange) sind dargestellt. Die reagierenden Atome, C-2 von Brevianamid F und C-1 von DMSPP, sind mit Sphären markiert. Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen sind durch schwarz gepunktete Linien dargestellt. Die Entfernung von der Prenylierungsposition C-2 zum am nächsten gelegenen Atom, C-3 von DMSPP, ist durch eine rot gepunktete Linie dargestellt.

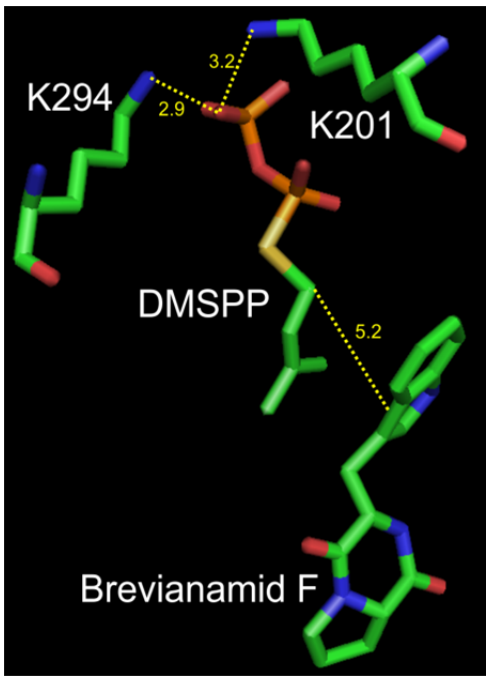


Abbildung 3-48: Aktives Zentrum von FtmPT1 mit Brevianamid F und DMSPP (PDB ID: 3O2K), erstellt mit PyMOL™ 1.7. Eingeblendet sind nur die beiden basischen Aminosäuren K201 und K294 in direkter Nähe zum Diphosphatrest von DMSPP. Gelbe gestrichelte Linien zeigen die kürzesten Abstände zwischen den Aminogruppen der Lysinreste und den Phosphatresten, sowie den Abstand zwischen den miteinander reagierenden Atomen C-2 (Brevianamid F) und C-1 (DMSPP) in Ångström.

Aufgrund der hochkonservierten Aminosäuren im Bereich des aktiven Zentrums in FgaPT2 und FtmPT1 wurden die beiden Zentren miteinander verglichen, um Aminosäuren bestimmen zu können, die für die Regio- und Substratspezifität mit verantwortlich sein könnten (Jost *et al.,* 2010). Einer der wichtigsten Unterschiede zwischen den beiden Enzymen liegt im rückwärtigen Teil der Bindungstasche. Während in FgaPT2 hier T102 lokalisiert ist, kann in FtmPT1 G115 gefunden werden (Abbildung 3-49). Durch das kleinere Glycin wird die Bindungstasche vergrößert, dies ermöglicht es Brevianamid F vermutlich,

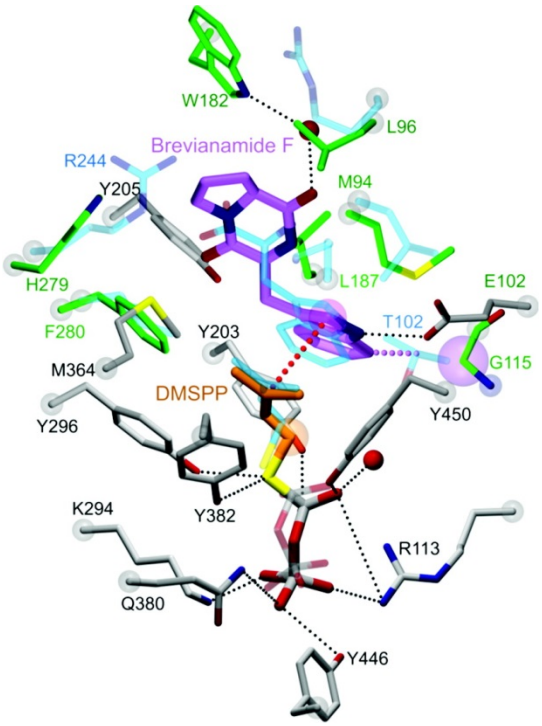


Abbildung 3-49: Vergleich der Substratbindung in FtmPT1 und FgaPT2 (Jost *et al.,* 2010). Äquivalente Aminosäuren sind grau dargestellt, Kohlenstoffatome unterschiedlicher Aminosäuren sind grün (FtmPT1) bzw. blau (FgaPT2) dargestellt. Die aromatischen Substrate sind violett (Brevianamid F) bzw. blau (L-Tryptophan) wiedergegeben. Die Bindungstasche in FtmPT1 wird durch den Austausch von T102 (FgaPT2) durch G115 erheblich vergrößert.

tiefer in die Tasche zu gelangen. Dadurch könnte die Prenylierung an Position C-2 anstatt C-4 wie bei FgaPT2 erklären. Die Mutation G115T in FtmPT1 könnte Aufschluss darüber bringen, ob G115 an der Determinierung der Prenylierungsposition beteiligt ist. Während R244 in FgaPT2 für die Stabilisierung der Carboxylgruppe von L-Tryptophan verantwortlich ist, ist hier in FtmPT1 H279 positioniert, was wiederum die Bindungstasche erheblich vergrößert. Außerdem könnte H279 durch Ausbildung von Wasserstoffbrücken an der Stabilisierung des Diketopiperazinrings beteiligt sein. Eine weitere wichtige Aminosäure scheint E102 zu sein. Ihre negative Ladung liegt im Bereich des Indolstickstoffs und könnte so diesen stabilisieren. Außerdem wäre auch eine Aktivierung des Indolrings durch Abstraktion eines Protons möglich.

3.3.1.2. Herstellung mutierter Derivate von FtmPT1

Mithilfe der zielgerichteten Mutagenese (2.5.10.2) sollten nun vier Einzelmutanten sowie schrittweise eine Dreifachmutante hergestellt werden, um die Beteiligung der jeweiligen Aminosäuren am Prenyltransfer zu untersuchen. Ausgangsplasmid war pAG12, das die Sequenz für FtmPT1-His_6 im Expressionsvektor pQE-70 enthält (Grundmann & Li 2005). In vier unabhängigen PCR-Experimenten wurden die Mutationen E102Q, G115T, Y205F und H279F eingeführt (Tabelle 3-23). Die G115T-Mutante wurde anschließend zur Einführung der Mutationen H279R und L187K weiterverwendet. Um die Bedeutung von G115 weiter zu untersuchen, wurden als zusätzliche Mutanten G115A, G115I und G115L hergestellt. Die korrekte Sequenz der Plasmide wurde durch Sequenzierung bestätigt und die Plasmide anschließend zur Expression der mutierten Proteine in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ verwendet.

Tabelle 3-23: Mittels zielgerichteter Mutagenese erzeugte Derivate von FtmPT1.

Mutation	Basenaustausch	Expressionskonstrukt
E102Q	GAG → **C**AG	pST1
G115T	GGG → **AC**G	pST2
Y205F	TAC → T**T**C	pST3
H279F	CAT → **TT**T	pST4
G115T_H279R	GGG → **AC**G CAT → C**G**T	pST5
G115T_H279R_L187K	GGG → **AC**G CAT → C**G**T CTC → **AAG**	pST6
G115A	GGG → G**C**G	pST9
G115I	GGG → **ATA**	pST10
G115L	GGG → **CT**G	pST11

Fette Buchstaben entsprechen veränderten Basen.

3.3.1.3. Überproduktion und Aufreinigung mutierter Derivate von FtmPT1

Die mutierten Derivate von FtmPT1 wurden mithilfe der Plasmide pST1-pST6 und pST9-pST11 unter denselben Bedingungen überproduziert, die bereits für FtmPT1 beschrieben sind (Grundmann & Li 2005). Nach einer Reinigung mittels Affinitätschromatographie wurden die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Das theoretische Molekulargewicht der Proteine liegt bei 53,4 kDa.

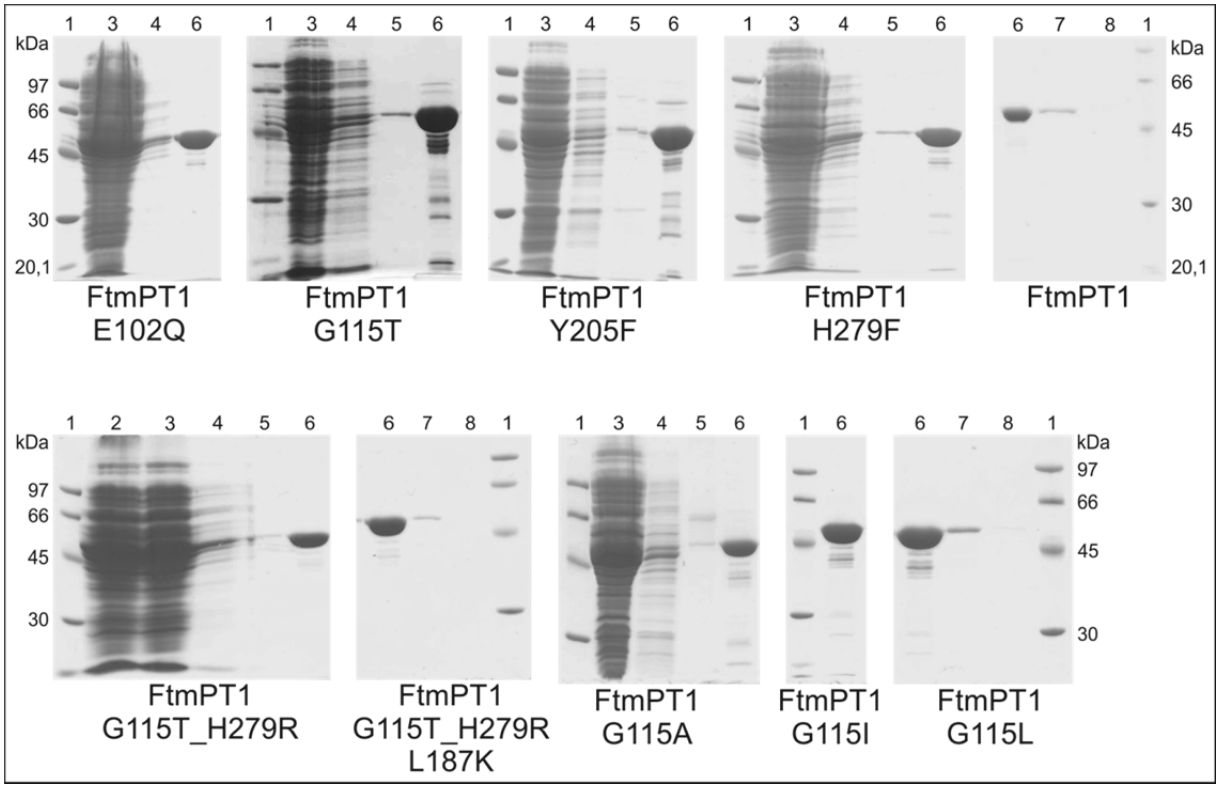


Abbildung 3-50: SDS-PAGE der Reinigung von FtmPT1-His$_6$ und mutierten Derivaten. Das theoretische Gewicht der Proteine beträgt 53,4 kDa. Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: lösliches Gesamtprotein. Spur 3: Durchflussfraktion. Spur 4: erste Waschfraktion. Spur 5: zweite Waschfraktion. Spur 6: erste Elutionsfraktion. Spur 8: zweite Elutionsfraktion. Spur 8: dritte Elutionsfraktion.

Alle mutierten Derivate als auch das Wildtypprotein konnten erfolgreich aufgereinigt werden und waren oberhalb der 45 kDa-Markerbande deutlich sichtbar (Abbildung 3-50, jeweils Spur 6). Es wurden Ausbeuten von 5,1 mg für FtmPT1_E102Q, 13,5 mg für FtmPT1_G115T, 10,9 mg für FtmPT1_Y205F, 5,0 mg für FtmPT1_H279F, 4,4 mg für FtmPT1_G115T_H279R, 4,4 mg für FtmPT1_G115T_H279R_L187K, 12,5 mg für FtmPT1_G115A, 25,0 mg für FtmPT1_G115I und 16,7 mg für FtmPT1_G115L je Liter Kultur erreicht.

3.3.1.4. Aktivitätstests mit Brevianamid F und L-Tryptophan

Die mutierten und aufgereinigten Proteine wurden auf ihre Aktivität hinsichtlich Brevianamid F hin getestet. FtmPT1_G115T wurde zusätzlich mit L-Tryptophan getestet. 5 µg Protein wurden in einem Endvolumen von 100 µl in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) mit 5 mM $CaCl_2$, 1 mM Brevianamid F oder L-Tryptophan und 2 mM DMAPP für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach der HPLC-Analyse konnte für FtmPT1 die Bildung von Tryprostatin B (absoluter Umsatz 52,8%) und einem zusätzlichen Produkt (absoluter Umsatz 1,3%) beobachtet werden, bei dem es sich wahrscheinlich um ein regulär C-3 prenyliertes Derivat handelt. Solche Produkte konnten nach Inkubation von FtmPT1 mit verschiedenen cyclischen Dipeptiden beobachtet werden (Wollinsky *et al.,* 2012b), die Struktur des Produktes von Brevianamid F konnte allerdings wegen des geringen Umsatzes nicht aufgeklärt werden (Abbildung 3-51). FtmPT1_Y205F und H279F zeigten verminderte Aktivitäten mit einer relativen Aktivität von 84,5% bzw. 83,1% im Vergleich zu FtmPT1 bezüglich des Verbrauchs an Brevianamid F.

Auch hier konnte jeweils ein zusätzliches Produkt registriert werden, das aufgrund der UV-Spektren höchstwahrscheinlich identisch mit dem von FtmPT1 ist. Allerdings waren bei den beiden Mutanten die absoluten Umsätze höher, nämlich 12,7% für Y205F und 6,6% für H279F. FtmPT1_G115T zeigte zwar fast keine Bildung von Tryprostatin B (0,4%), aber einen Verbrauch an Brevianamid F in Höhe von 14,4% relativ zu FtmPT1. Die Retentionszeit des Produktes von FtmPT1_G115T war unterschiedlich zu der von Tryprostatin B als auch zu der Retentionszeit des zusätzlichen Produktes, das bei FtmPT1 sowie den Mutanten Y205F und H279F beobachtet werden konnte. Allerdings waren deren UV-Spektren recht ähnlich, was für eine mögliche C-3-Prenylierung spricht (Abbildung 3-52).

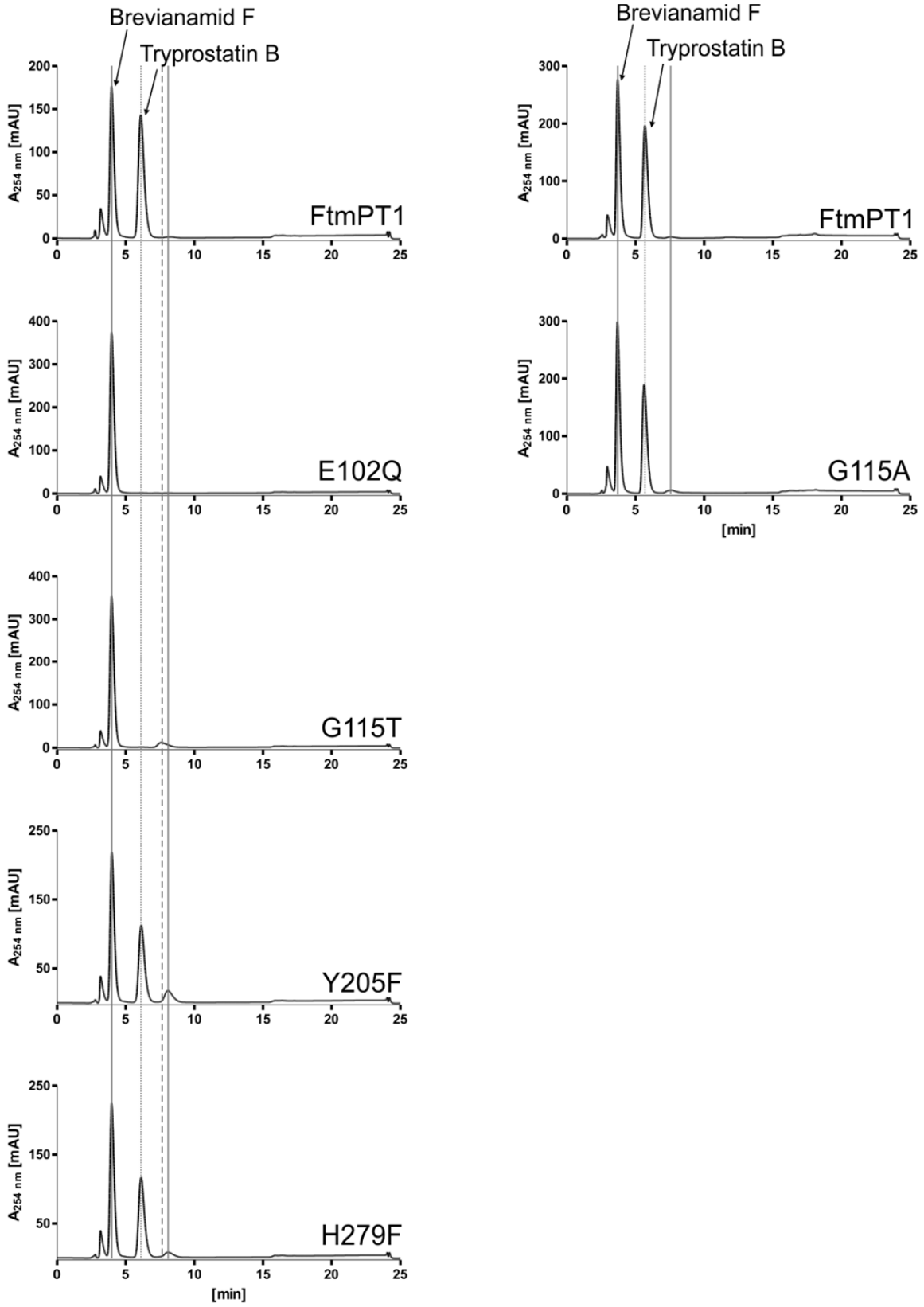


Abbildung 3-51: HPLC-Chromatogramme der Inkubationen von FtmPT1 und mutierten Derivaten mit Brevianamid F. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C für eine Stunde inkubiert. Tryprostatin B, markiert durch eine gepunktete Linie, ist das Hauptprodukt von FtmPT1. Das zweite Produkt (durchgehende Linie) ist im Fall von FtmPT1 schwach zu erkennen, mit Y205F, H279F und G115A konnte ein höherer Umsatz erreicht werden. FtmPT1_G115T setze Brevianamid F zu einem bisher unbekannten Produkt (gestrichelte Linie) um.

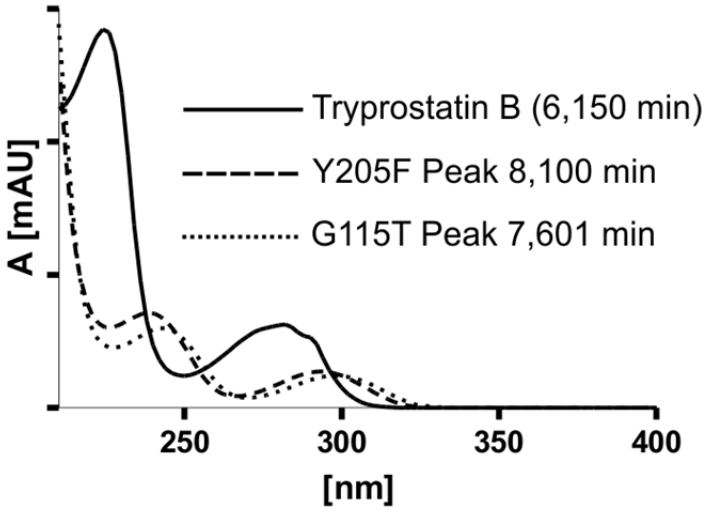


Abbildung 3-52: Vergleich der UV-Spektren der enzymatischen Produkte. Gezeigt sind die UV-Spektren von Tryprostatin B mit einer Retentionszeit von 6,150 min, das zweite Produkt von FtmPT1_Y205F bei 8,100 min und das Produkt von FtmPT1_G115T bei 7,601 min. Die Produkte bei 8,100 und 7,601 min sind deutlich verschieden vom C-2-prenylierten Tryprostatin B.

FtmPT1_G115A zeigte mit 92,7% relativem Umsatz von Brevianamid F eine leicht verminderte Aktivität. Für FtmPT1_E102Q konnte keine Produktbildung beobachtet werden. Erst nach Inkubation für 16 h konnten 2,1% relative Aktivität erhalten werden. Die übrigen mutierten Proteine, FtmPT1_G115I, FtmPT1_G115L, FtmPT1_G115T_H279R und FtmPT1_G115T_H279R_L187K waren gänzlich inaktiv (Abbildung 3-53). Interessanterweise konnte durch G115L nach längerer Inkubation von 16 h eine geringe Menge von Brevianamid F (1%) umgesetzt werden, wobei es sich bei dem Produkt nicht um Tryprostatin B handelte. Die Struktur konnte allerdings wegen der geringen Umsetzung nicht aufgeklärt werden.

FtmPT1 und die beiden mutierten Proteine G115T und G115A wurden zusätzlich auf ihre Aktivität bezüglich L-Tryptophan hin getestet. FtmPT1 setzt diese Aminosäure mit 0,4% kaum um. G115A zeigte eine ähnliche Aktivität mit 0,5% absolutem Umsatz. Für G115T konnte kein Umsatz gemessen werden.

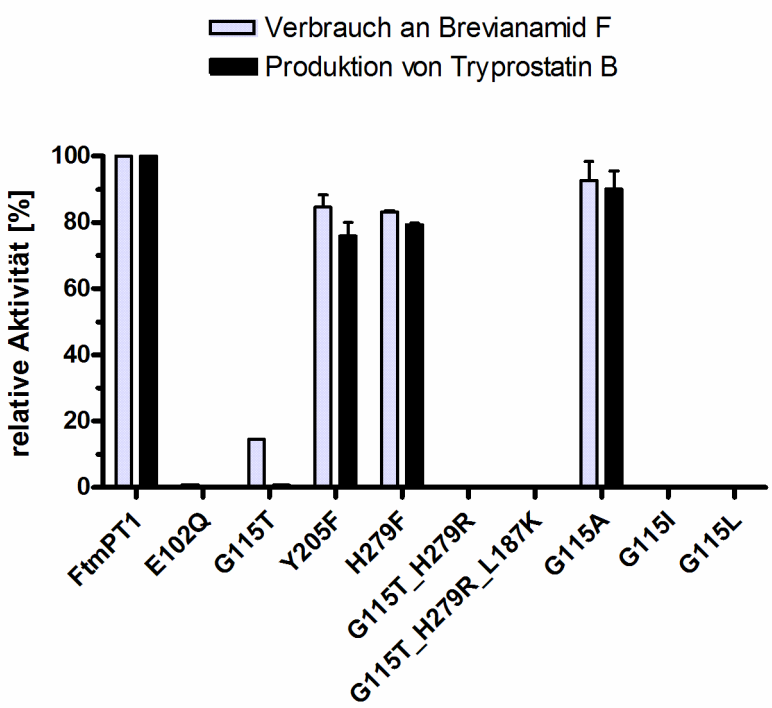


Abbildung 3-53: Relative Aktivität von FtmPT1 und mutierten Derivaten. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen nach 1 h Inkubation bei 37 °C. Die für FtmPT1 bestimmte Aktivität wurde als 100% definiert.

3.3.1.5. Untersuchung der Sekundärstruktur von mutierten Derivaten mittels Circulardichroismus

Die Einführung einer Mutation kann zur Bildung eines minder funktionalen Proteins führen, wenn dadurch die Sekundärstruktur erheblich beeinflusst wird. Mithilfe der CD-Spektroskopie lassen sich auf einfache Weise die Sekundärstrukturen von verschiedenen Proteinen vergleichen. Da α-Helices, β-Faltblatt- und *random-coil*-Strukturen unterschiedliche Absorptionen im Absorptionsbereich der Peptidbindungen (240–180 nm) aufweisen, lässt sich aus einem CD-Spektrum entnehmen, ob signifikante Deformationen der Sekundärstruktur stattgefunden haben (Kelly & Price 2000). CD-Spektren wurden von FtmPT1 und den mutierten Derivaten E102Q, G115T, Y205F und H279F aufgenommen. Dazu wurden jeweils etwa 100 µg Protein mit 50 mM Tris·HCl (pH 7,5) bei 4 °C auf dasselbe Endvolumen verdünnt und sofort vermessen. Für alle Proben konnte im Bereich von 270–200 nm ein klares Spektrum erhalten werden (Abbildung 3-54). Alle Proteine wiesen ein vergleichbares Spektrum mit einem Minimum um 220 – 210 nm auf, was charakteristisch für α-Helices und β-Faltblattstrukturen ist. Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Aktivität der untersuchten Derivate von FtmPT1 nicht durch größere Abweichungen von der ursprünglichen Sekundärstruktur negativ beeinflusst wurde. Im Fall von FtmPT1_E102Q liegt dementsprechend der Verlust der Aktivität in den physikochemischen Eigenschaften der mutierten Aminosäure begründet und nicht in einer veränderten Sekundärstruktur.

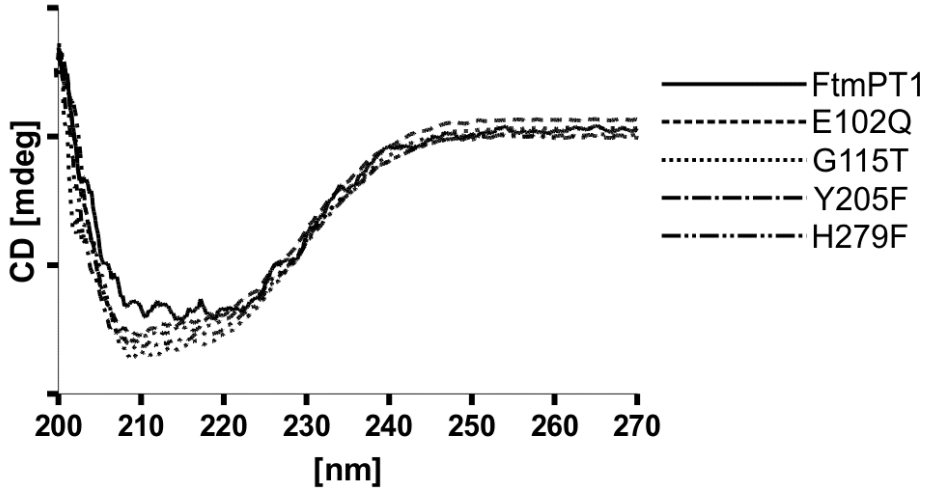


Abbildung 3-54: CD-Spektren von FtmPT1 und mutierten Derivaten. Zur besseren Vergleichbarkeit ist das Spektrum von FtmPT1 vergrößert, das von G115T verkleinert dargestellt.

3.3.1.6. Strukturaufklärung des enzymatischen Produktes von FtmPT1_G115T mit Brevianamid F

Während die meisten mutierten Derivate von FtmPT1 dieselben enzymatischen Produkte wie das Wildtypprotein lieferten, konnte das Produkt von FtmPT1_G115T bisher in keinen Inkubationen mit FtmPT1 beobachtet werden. Nach Aufreinigung mittels semipräparativer HPLC konnte durch ESI-Massenspektrometrie die Masse eines einfach prenylierten Derivates von Brevianamid F erhalten werden: *m/z* (Intensität): 725 (46%) $[2M+Na]^+$, 374 (24%) $[M+Na]^+$, 352 (46%) $[M+H]^+$ bei einer theoretischen relativen Molekülmasse von 351 ($C_{21}H_{25}N_3O_2$). NMR-Daten sind in Tabelle 3-24 wiedergegeben. Im ^{1}H-NMR-Spektrum waren deutlich die Signale einer reversen Prenylierung bei 5.98 (dd, 17.4, 10.8), 5.10 bzw. 5.07 (jeweils dd, 10.8, 0.7 bzw. 17.4, 0.7) und 1.11 (s) und 1.01 ppm (s) zu erkennen. Da das Signal von H-2 bei 5.46 ppm (s) wiederzufinden war, konnte wie bereits vermutet keine C-2-Prenylierung stattgefunden haben. HMBC-Korrelationen zwischen Kernen des Dipeptid-grundgerüsts und des Prenylrests waren nur zwischen H-2 und C-3‘ und zwischen H-4‘ bzw. H-5‘ und C-3 zu beobachten, die Prenylierung muss also an Position C-3 stattgefunden haben. Die genaue Orientierung des Prenylrests wurde mithilfe eines NOE-Spektrums ausgehend von H-11 untersucht. Für dieses Proton ließen sich starke Korrelationen zu H-10_{syn} und schwache zu H-10_{anti} finden. H-11 und H-10_{syn} liegen folglich auf derselben Seite des Moleküls. Korrelationen zwischen Protonen des Prenylrests und des Dipeptids konnten zwischen H-2‘ und H-10_{syn} (schwach), zwischen H-4‘ und H-10_{anti} und H-10_{syn} (jeweils schwach) und zwischen H-5‘ und H-10_{anti} (schwach) wiedergefunden werden.

Tabelle 3-24: NMR-Daten des enzymatischen Produktes von FtmPT1_G115T mit Brevianamid F.

Position	δ_H, mult., *J*	δ_C	HMBC-Korrelationen	NOE-Korrelationen
1	-[a]	/	-[a]	-[a]
2	5.46, s	77.18	C8, C9, C11, C3‘	H-2‘, H-4‘, H-5‘
3	/	61.59	/	/
4	7.16, d, 7.6	124.88	C6, C8	**H-5**, **H-10$_{syn}$**, H-4‘, *H-5‘*
5	6.77, t, 7.6	118.73	C7, C9	**H-4**, **H-6**
6	7.11, t, 7.6	128.71	C4, C8	**H-5**, **H-7**
7	6.59, d, 7.6	109.17	C5, C9	**H-6**
8	/	149.62	/	/
9	/	129.00	/	/
10$_{syn}$[b] 10$_{anti}$[b]	2.54, dd, 12.6, 6.7 2.49, dd, 12.6, 11.2	34.94	C2, C3, C9, C11, C3‘ C3, C9, C11, C16, C3‘	**H-4**, **H-11**, *H-2‘*, *H-4‘* *H-11*, H-2‘, *H-4‘*, *H-5‘*
11	3.99, dd, 11.2, 6.7	60.24	C14	**H-10$_{syn}$**, *H-10$_{anti}$*
13	/	166.63	/	/
14	4.05, m	60.31	C11	**H-19**
16	/	165.73	/	/
17	3.50, m 3.56, m	44.96	C18	**H-18** **H-18**
18	2.04, m 1.89, m	22.78	C17	*H-14*, **H-17**, H-19 **H-17**, H-19
19	2.30, m 2.13, m	27.55	C17	**H-14**, H-18
1′	5.10, dd, 10.8, 0.7 5.07, dd, 17.4, 0.7	114.22	C2‘	H-2‘, H-4‘, H-5‘
2′	5.98, dd, 17.4, 10.8	143.38	C3’, C4’, C5’	H-2, H-10$_{anti}$, *H-10$_{syn}$*, H-1’, *H-4’*, *H-5’*
3′	/	40.61	/	/
4′	1.11, s	22.25	C3, C2’, C3’, C5’	H-2, H-4, *H-10$_{anti}$*, *H-10$_{syn}$*, *H-2’*, *H-5’*
5′	1.01, s	22.58	C3, C2’, C3’, C4’	H-2, *H-4*, *H-10$_{anti}$*, H-1’, *H-2’*, *H-4’*

Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett. [a]: Signale oder Korrelationen nicht beobachtet. [b]: H-10$_{syn}$ steht in *cis*-Konfiguration zu H-11, H-10$_{anti}$ in *trans*-Konfiguration. NOESY-Korrelationen: **starke**, mittlere, *schwache* Korrelationen.

H-2‘ und H-10$_{anti}$ zeigten mittel starke Korrelationen. Für H-2 waren außerdem mittel starke Korrelationen zu den Protonen H-2‘, H-4‘ und H-5‘ zu beobachten. Die Protonen H-2, H-2‘, H-4‘, H-5‘ und H-10$_{anti}$ befinden sich also auf derselben, H-11 und H-10$_{syn}$ abgewandten Seite.Die Daten stimmten gut mit verfügbaren Literaturwerten von C-3-revers prenyliertem Brevianamid F überein (Yu *et al.,* 2013). Hier sprach nämlich das Erscheinen von H-11 als Dublett vom Dublett mit Kopplungskonstanten um 11 bzw. 7 Hz für die Einführung von zwei Stereozentren an C-2 (*S*-Konfiguration) und C-3 (*R*-Konfiguration). Das enzymatische Produkt konnte also als *cyclo*-(*2S,3R*)-3-Dimethylallyl-L-Trp-L-Pro identifiziert werden (Abbildung 3-55).

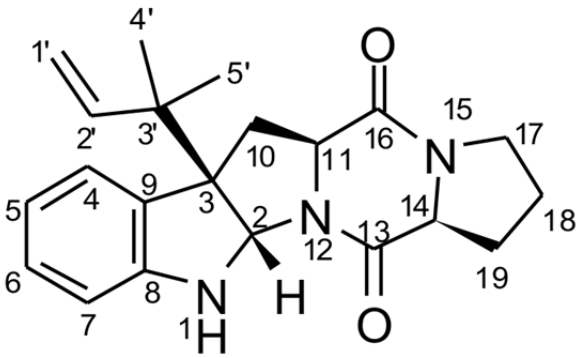


Abbildung 3-55: Struktur des enzymatischen Produktes von FtmPT1_G115T mit Brevianamid F.

3.3.2. Zielgerichtete Mutagenese von Prenyltransferasen zur Änderung der Substrat- und Regiospezifität

3.3.2.1. Einleitung

Wie bereits in Kapitel 3.3.1.6 beschrieben, führte der Austausch der Aminosäure Glycin 115 gegen Threonin in FtmPT1, unter Verwendung von Brevianamid F, zu einer Veränderung der Prenylierungsposition von C-2 nach C-3 und des Prenylierungsmusters von regulär nach revers. Solche Reaktionen waren bisher nur von Prenyltransferasen wie AnaPT (Yin *et al.,* 2009b), CdpNPT (Yin *et al.,* 2007) oder CdpC3PT (Yin *et al.,* 2010) bekannt. Das Produkt von FtmPT1_G115T besitzt wie jene von CdpC3PT und CdpNPT eine (*2S,3R*)-Konfiguration, während Produkte von AnaPT eine (*2R,3S*)-Konfiguration aufweisen (Yin *et al.,* 2009a). Vor diesem Hintergrund sollte auch untersucht werden, ob FtmPT1_G115T auch andere cyclische Dipeptide entsprechend umsetzen kann. Da für FtmPT1 eine *PT-barrel*-Struktur gefunden wurde, die bisher nur von bakteriellen Prenyltransferasen der CloQ/NphB-Gruppe bekannt war (Kuzuyama *et al.,* 2005; Metzger *et al.,* 2010), sollte die Akzeptanz von Hydroxynaphthalinderivaten getestet werden und ob mutierte Derivate von FtmPT1 möglicherweise eine veränderte Substratspezifität zeigen.

Interessanterweise zeigen die C-3-Prenyltransferasen neben der unterschiedlichen Orientierung des Prenylrestes auch einen Unterschied in ihrer Aminosäuresequenz, der die Positionen entsprechend G115 in FtmPT1 betrifft. Während FtmPT1 und AnaPT an dieser Position beide über einen Glycinrest verfügen, wird dieser Rest in CdpC3PT und CdpNPT jeweils durch ein Alanin ersetzt (s. 6.11). Daher sollte A115 in CdpC3PT zu Glycin und Threonin mutiert werden, um die Auswirkungen zu untersuchen.

In CdpNPT wird das aromatische Substrat (*S*)-Benzodiazepindion unter anderem durch die Reste A131, V206 und F223 stabilisiert (Schuller *et al.,* 2012). Diese Positionen entsprechen G115, L187 und Y205 in FtmPT1. Mit der Dreifachmutation G115A_L187A_Y205F ließen sich die Verhältnisse aus CdpNPT in FtmPT1 möglicherweise nachbilden, wobei L187A dem Substrat zusätzlich mehr Raum bieten würde als L187V. Mit diesem FtmPT1-Derivat könnte untersucht werden, ob dadurch auch eine C-3-Prenylierung erreicht werden kann oder ob eine Änderung der Substratspezifität stattfindet.

CTrpPT dagegen katalysiert die reverse N-1- und reguläre C-7-Prenylierung von *cyclo*-L-Trp-L-Trp (Zou *et al.,* 2010). Um Informationen zur allgemeinen Bedeutung der betreffenden Aminosäure zu untersuchen, sollte G117 in CTrpPT ebenfalls gegen Threonin ausgetauscht werden.

3.3.2.2. Aktivitätstests von FtmPT1_G115T mit cyclischen Dipeptiden

FtmPT1_G115T wurde mit Brevianamid F (*cyclo*-L-Trp-L-Pro) und sieben weiteren tryptophanhaltigen cyclischen Dipeptiden auf seine Prenylierungsaktivität hin getestet. 5 µg Protein wurden in einem Endvolumen von 100 µl in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) mit 5 mM $CaCl_2$, 1 mM cyclischem Dipeptid und 2 mM DMAPP bei 37 °C für 1 h und auch 16 h inkubiert, um etwaige Unterschiede besser erkennen zu können. Identische Reaktionsansätze mit FtmPT1 dienten als Vergleich. Nach HPLC-Analyse konnte in den Inkubationen mit FtmPT1_G115T nach 16 h eine Umsetzung zwischen 0,4% und 41,4% (Tabelle 3-25) beobachtet werden, wobei das Produktspektrum stets unterschiedlich von dem von FtmPT1 war (Abbildung 3-56). Brevianamid F (**10a**) wurde am besten akzeptiert und nach 16-stündiger Umsetzung konnte erneut ein C-3 prenyliertes Produkt (**10d**) (41,4%) und eine geringe Menge Tryprostatin B (**10b**) (4,5%) erhalten werden. Auch für *cyclo*-D-Trp-L-Pro (**11a**), *cyclo*-L-Leu-L-Trp (**13a**), *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**16a**) und *cyclo*-L-Phe-L-Trp (**17a**) konnte eine Produktbildung zwischen 12,8% und 21,6% beobachtet werden, während Inkubationen mit *cyclo*-Gly-L-Trp (**12a**), *cyclo*-L-Trp-L-Tyr (**14a**) und *cyclo*-D-Trp-L-Tyr (**15a**) nur geringe Mengen Produkt lieferten (2,1% bis 5,8%). Die UV-Spekten der Produkte waren jedoch vergleichbar, so dass auch hier eine reverse C-3-Prenylierung wahrscheinlich ist.

Tabelle 3-25: Absoluter Umsatz von cyclischen Dipeptiden mit FtmPT1 bzw. FtmPT1_G115T.

Substrat	Absoluter Umsatz [%] nach 1 h/16 h*							
	FtmPT1				FtmPT1_G115T			
Produkt	b	c	d	e	b	d	e	f
Brevianamid F (**10a**)	43,2/57,3	< 0,1/1,1	-	-	1,3/4,5	13,5/41,4	-	-
cyclo-D-Trp-L-Pro (**11a**)	36,2/43,4	1,0/1,5	-	-	< 0,1/0,6	3,2/21,6	-	-
cyclo-Gly-L-Trp (**12a**)	12,3/33,0	4,1/13,8	-	-	-	0,5/2,2	-	-
cyclo-L-Leu-L-Trp (**13a**)	36,5/52,8	1,1/2,1	-	-	< 0,1/0,4	3,7/17,7	-	-
cyclo-L-Trp-L-Tyr (**14a**)	25,5/63,8	0,4/2,4	0,5/2,8	-	-	-	1,2/5,8	-
cyclo-D-Trp-L-Tyr (**15a**)	0,5/3,3	1,0/19,0	-	-	-	0,8/2,1	-	-
cyclo-L-Trp-L-Trp (**16a**)	25,4/39,3	1,0/2,8	1,5/2,7	0,5/1,4	-	-	-	2,4/17,4
cyclo-L-Phe-L-Trp (**17a**)	12,0/30,7	2,3/11,1	-	-	-	2,3/12,8	-	-

*: Mittelwerte aus zwei unabhängigen Bestimmungen.

3.3.2.3 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte von FtmPT1_G115T mit cyclischen Dipeptiden

Substrate, die die höchsten Umsetzungen mit FtmPT1_G115T aufwiesen, *cyclo*-D-Trp-L-Pro (**11a**), *cyclo*-L-Leu-L-Trp (**13a**) und *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**16a**) wurden im Maßstab von 10 ml mit dem Protein inkubiert und die Produkte anschließend aus den Reaktionsansätzen mittels HPLC isoliert. Für die Produkte mit *cyclo*-L-Leu-L-Trp (**13d**) und *cyclo*-L-Trp-L-Trp (**16f**) konnten auswertbare ^{1}H-NMR-Spektren erhalten werden (Tabelle 3-26). Für beide Produkte konnten Signale eines revers verknüpften Dimethylallylrests gefunden werden, mit zwei Dubletts vom Dublett für H-1‘ bei 5.12 und 5.08 (**13d**) bzw. 5.13 und 5.08 ppm (**16f**)

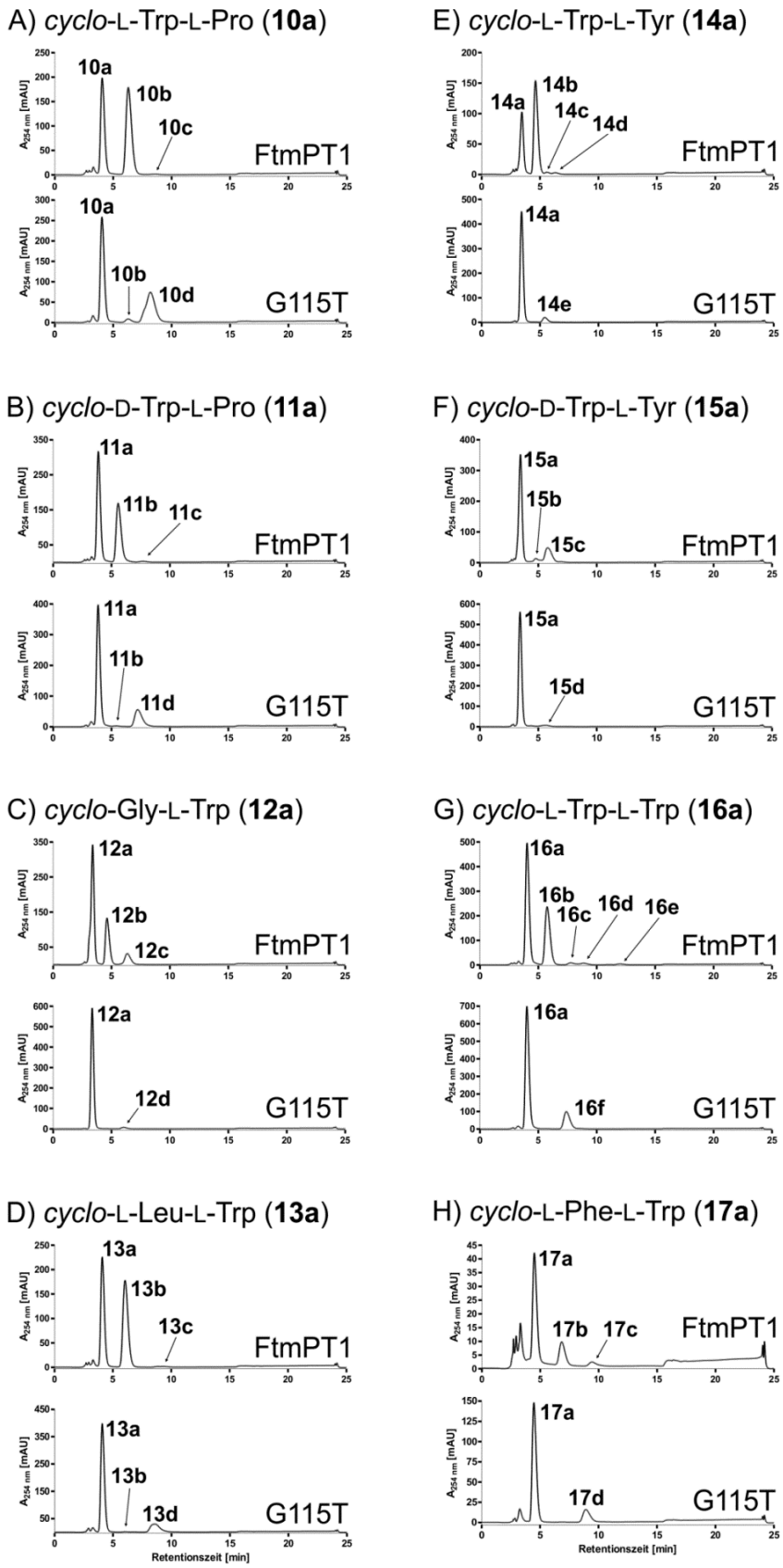
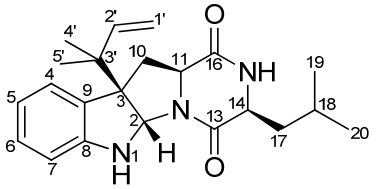
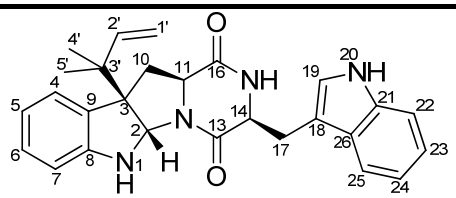


Abbildung 3-56: HPLC-Chromatogramme der Inkubationen von FtmPT1 und FtmPT1_G115T mit Tryptophan-haltigen cyclischen Dipeptiden. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C für 16 h inkubiert. Die Strukturen von 10b, 12b, 13b und 16b konnten bereits als reguläre C 2-Prenylierungen aufgeklärt werden (Grundmann & Li 2005), die von 12c als reguläre C 3-Prenylierung (Wollinsky *et al.,* 2012b). Für die Strukturaufklärung von **10d** s. Kapitel 3.3.1.6.

(*J* jeweils 10.8, 1.1 Hz bzw. 17.4, 1.1 Hz) und jeweils einem Dublett vom Dublett für H-2‘ bei 5.97 ppm (J = 17.4, 10.8 Hz). Das Signal für H-2 erschien bei 5.50 (**13d**) bzw. 5.55 ppm (**16f**), d. h. außerhalb des aromatischen Bereichs. Damit hat auch hier eine C-3-reverse Prenylierung mit Ringschluss zwischen C-2 und N-12 (vgl. Kapitel 3.3.1.6) stattgefunden. Die Strukturen konnten jeweils auch durch einen Vergleich mit bereits veröffentlichten Daten von C-3-revers prenyliertem *cyclo*-L-Leu-L-Trp und *cyclo*-L-Trp-L-Trp (Yin *et al.,* 2010) bestätigt werden (Tabelle 3-26).

Tabelle 3-26: ^{1}H-NMR-Daten der enzymatischen Produkte 13d und 16f von FtmPT1_G115T mit cyclischen Dipeptiden.

Substanz				
	cyclo-3-Dimethylallyl-L-Leu-L-Trp (**13d**)	Referenz „**3a**“ (Yin *et al.,* 2010)	*cyclo*-3-Dimethylallyl-L-Trp-L-Trp (**16f**)	Referenz „**3b**“ (Yin *et al.,* 2010)
Position	δ_H, mult., *J*	δ_H, mult., *J*	δ_H, mult., *J*	δ_H, mult., *J*
1	-	-	8.12, s [c]	-
2	5.50, s	5.50, s	5.55, s	5.55, s
3	-	-	-	-
4	7.16, d, 7.4	7.16, d, 7.4	7.14 [d]	7.14 [e]
5	6.76, t, 7.4	6.76, t, 7.5	6.75, td, 7.5, 0.9	6.75, td, 7.5, 0.8
6	7,10, m	7.10, t, 7.6	7.11 [d]	7.11 [e]
7	6.58, d, 7.8	6.58, d, 7.8	6.61, d, 7.4	6.61, d, 7.8
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	2.55, dd, 13.0, 6.5 2.47, m	2.55, dd, 12.7, 6.4 2.47, t, 11.9	2.52, dd, 12.7, 6.4 2.42, dd, 12.6, 11.2	2.52, dd, 12.6, 6.3 2.42, t, 11.9
11	3.95, m [a]	3.95, m	3.92, ddd, 10.7, 6.0, 1.7	3.92, ddd, 11.1,6.2, 1.6
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	3.95, m [a]	3.95, m	4.31, ddd, 11.3, 4.1, 2.0	4.31, ddd, 10.9, 3.6, 1.8
15	5.61, s	5.67, s	5.66, s	5.69, s
16	-	-	-	-
17	2.02, m	2.02, ddd, 14.2, 10.2, 3.8	3.75, ddd, 14.8, 3.7, 1.1	3.74, ddd, 14.7, 3.3, 0.8
	- [b]	1.57, ddd, 14.5, 9.6, 5.0	2.97, dd, 15.1, 10.9	2.98, dd, 15.0, 11.0
18	- [b]	1.68, m	-	-
19	0.99, d, 6.6	0.99, d, 6.6	7.11 [d]	7.11, s
20	0.92, d, 6.6	0.92, d, 6.6	8.12, s [c]	8.13, s
21	-	-	-	-
22	-	-	7.39, dt, 8.3, 0.9	7.38, d, 8.2
23	-	-	7.22, dt, 8.3, 1.3	7.22, td, 7.7, 0.9
24	-	-	7.13 [d]	7.13 [e]
25	-	-	7.55, dd, 7.9, 0.6	7.55, d, 8.1
26	-	-	-	-
1‘	5.12, dd, 10.8, 1.1 5.08, dd, 17.4, 1.1	5.12, d, 10.8 5.08, d, 17.3	5.13, dd, 10.8, 1.1 5.08, dd, 17.4, 1.1	5.12, dd, 10.8, 1.0 5.08, dd, 17.4, 1.0
2‘	5.97, dd, 17.4, 10.8	5.97, dd, 17.3, 10.8	5.97, dd, 17.4, 10.8	5.97, dd, 17.4, 10.8
3‘	-	-	-	-
4‘	1.01, s	1.01, s	1.01, s	1.01, s
5‘	1.12, s	1.12, s	1.11, s	1.11, s

^{1}H-NMR-Daten in $CDCl_3$, 500 MHz. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, br s: breites Singulett, d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett. [a]: Überlappende Signale. [b]: vom Wassersignal überlagert. [c]: Signale austauschbar. [d]: Überlappende Signale. [e]: Überlappende Signale.

3.3.2.4 Aktivitätstest mit Hydroxynaphthalinderivaten

In einem ersten Vorversuch wurden FtmPT1 und seine mutierten Derivate auf ihre Aktivität gegenüber elf Hydroxynaphthalinderivaten getestet. Jeweils 5 µg Protein wurden in einem Endvolumen von 100 µl in 50 mM Tris•HCl (pH 7,5) mit 5 mM $CaCl_2$, 1 mM Naphthalinderivat und 2 mM DMAPP bei 37 °C für 1 h inkubiert. Nach Auswertung der HPLC-Analyse konnten für FtmPT1_Y205F die stärksten Umsetzungen beobachtet werden, daraufhin wurden die Aktivitätstests mit FtmPT1 und FtmPT1_Y205F unter optimierten Bedingungen wiederholt. Mit Ausnahme von 2,3-Dihydroxynaphthalin (**24a**) und 2,6-Dihydroxynaphthalin (**25a**) war der Umsatz durch Y205F jeweils höher als durch das Wildtypprotein (Tabelle 3-27). Die Produkte der beiden Proteine waren dabei stets identisch (Abbildung 3-57). 1-Naphthol (**18a**), 1,3-Dihydroxynaphthalin (**20a**), 1,7-Dihydroxynaphthalin (**23a**) und 8-Amino-2-naphthol (**28a**) wurden mit Umsetzungen zwischen 8,7% und 29,9% am besten akzeptiert.

Tabelle 3-27: Umsatz von Hydroxynaphthalinen durch FtmPT1 bzw. FtmPT1_Y205F.

	Umsatz [%]	
Substrat	**FtmPT1**	**FtmPT1_Y205F**
1-Naphthol (**18a**)	4,5	29,9 (664)
2-Naphthol (**19a**)	< 0,1	< 0,1
1,3-Dihydroxynaphthalin (**20a**)	< 0,1	19,7 (n. b.)
1,5-Dihydroxynaphthalin (**21a**)	0,2	0,2 (100)
1,6-Dihydroxynaphthalin (**22a**)	0,6	3,4 (567)
1,7-Dihydroxynaphthalin (**23a**)	3,7	17,1 (462)
2,3-Dihydroxynaphthalin (**24a**)	9,2	2,5 (27)
2,6-Dihydroxynaphthalin (**25a**)	1,0	0,3 (30)
2,7-Dihydroxynaphthalin (**26a**)	1,3	3,0 (231)
5-Amino-1-naphthol (**27a**)	< 0,1	< 0,1
8-Amino-2-naphthol (**28a**)	3,8	8,7 (229)

Aufgelistet ist jeweils der absolute Umsatz [%] bezogen auf die Produktbildung. Für FtmPT1_Y205F ist der Umsatz relativ zu FtmPT1 zusätzlich in Klammern angegeben. n. b.: nicht bestimmbar.

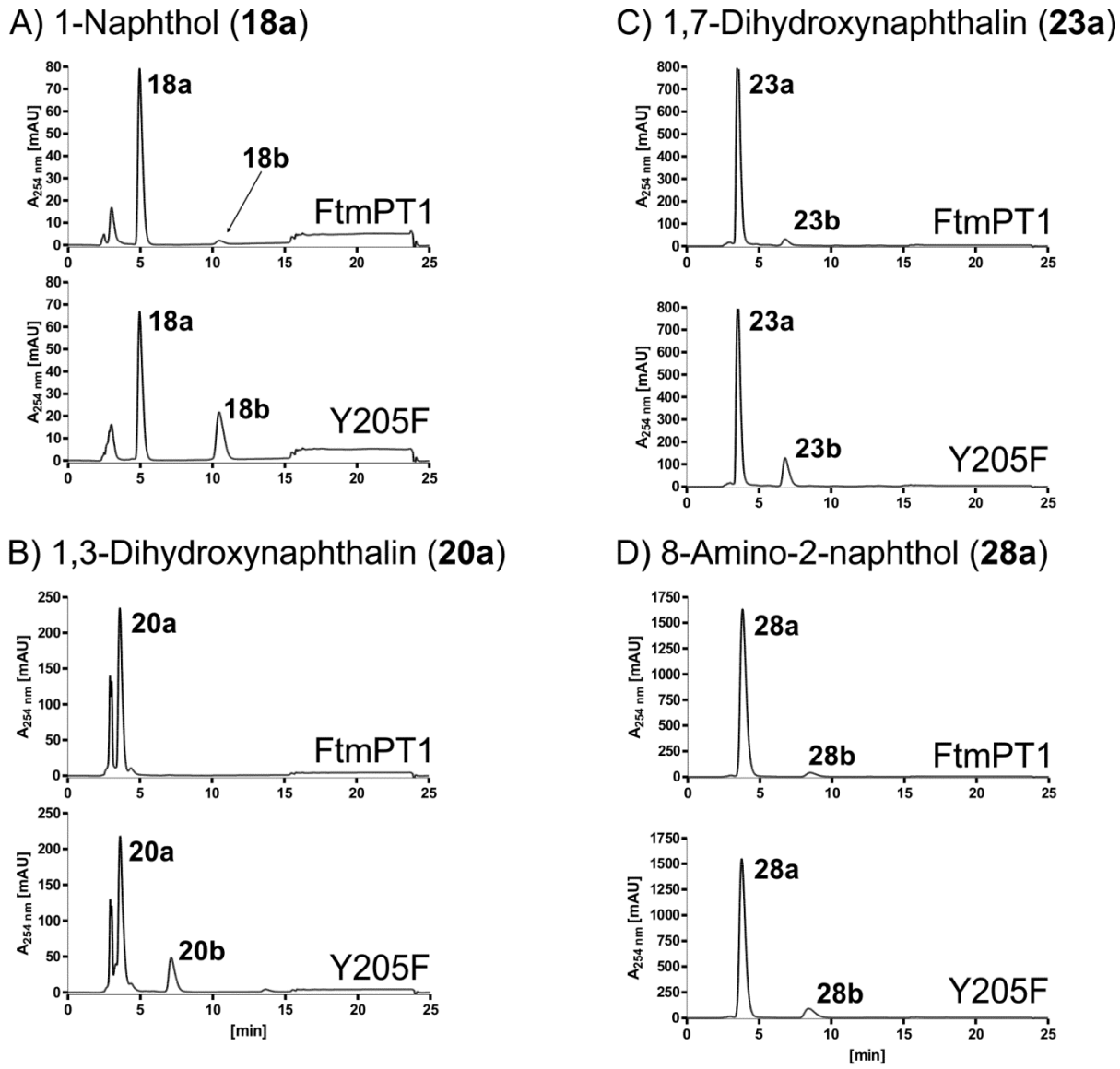


Abbildung 3-57: HPLC-Chromatogramme der Inkubationen von FtmPT1 und FtmPT1_Y205F mit am besten akzeptierten Hydroxynaphthalinen. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C für 1 h inkubiert.

3.3.2.5 Strukturaufklärung der enzymatischen Produkte von FtmPT1_Y205F mit Hydroxynaphthalinderivaten

Da bereits Referenzdaten zu prenylierten Hydroxynaphthalinen vorlagen, wurde versucht Hinweise auf die Struktur der Produkte durch direkte Vergleiche der HPLC-Chromatogramme zu erhalten. Parallele HPLC-Analysen von Inkubationen von FtmPT1_Y205F und CdpC3PT mit 1-Naphthol (**18a**) und 1,7-Dihydroxynaphthalin (**23a**) zeigten, dass die Produkte der beiden Enzyme höchstwahrscheinlich identisch waren. Für CdpC3PT konnten die Produkte als regulär C-4-prenylierte Strukturen nachgewiesen werden (Yu *et al.,* 2011); diese Struktur wird auch für **18b** und **23b** vermutet (Abbildung 3-58).

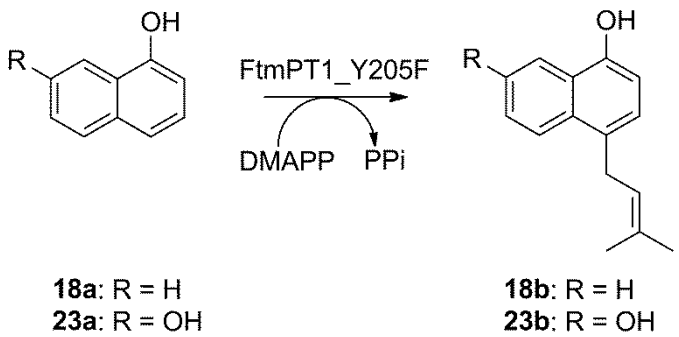


Abbildung 3-58: Vermutete Reaktion zur Bildung der enzymatischen Produkte 18b und 23b durch FtmPT1_Y205F.

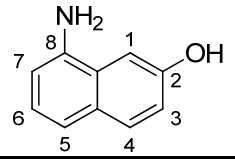
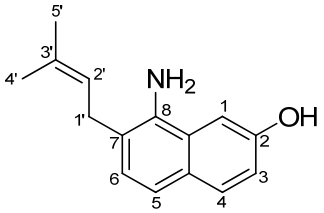
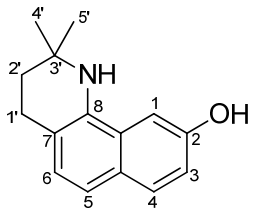
Das enzymatische Produkt aus der Inkubation von FtmPT1_Y205F mit 8-Amino-2-naphthol (**28a**) wurde durch eine semipräparative HPLC, aufgrund der besseren Auflösung, unter Verwendung eines Fließmittelgradienten mit 0,5% (v/v) TFA isoliert und mittels ^{1}H-NMR analysiert. Hier wurde ein Spektrum eines Gemisches aus zwei Substanzen (**28b** und **28c**) erhalten. Als die Isolierung ohne TFA wiederholt wurde, konnte nur ein Produkt beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass das Produkt (**28b**) säurelabil ist. Zusätzlich wurde das Gemisch getrennt und beide Substanzen untersucht. Für **28b** konnte mittels HR-ESI-MS ein Ion mit *m/z* 228,1388 ($[M+H]^+$) bestimmt werden, was einer einfachen Prenylierung entspricht (Tabelle 3-28). Für **28c** konnte ein Ion mit *m/z* 246,1494 gefunden werden; dies kann durch eine einfache Prenylierung und die Addition eines Wassermoleküls erklärt werden. Im ^{1}H-NMR-Spektrum von **28b** waren deutlich die Signale eines regulär verknüpften Prenylrests bei 5.31 ppm (t sept, J = 7.0, 1.5 Hz), 3.60 ppm (d, J = 7.2 Hz), 1.79 ppm (s) und 1.73 ppm (d, J = 1.0 Hz) zu erkennen (Tabelle 3-29). Dagegen konnten nur fünf der sechs aromatischen Protonen wiedergefunden werden; es hat folglich eine C-Prenylierung stattgefunden. Die Signale der Protonen H-1 (7.23 ppm, d, J = 2.5 Hz), H-3 (7.05 ppm, dd, J = 9.1, 2.5 Hz) und H-4 (7.81 ppm, d, J = 9.1 Hz) waren weiterhin zu detektieren, während für die übrigen zwei Protonen jeweils ein Dublett bei 6.89 ppm (d, J = 7.5 Hz) bzw. 6.7 ppm (d, J = 7.5 Hz) gefunden werden konnte, so dass der Dimethylallylrest entweder auf die Position C-5 oder C-7 übertragen wurde. Das ^{1}H-NMR-Spektrum von **28c** wies ebenfalls Signale von fünf aromatischen Protonen auf, wohingegen die Signale der Protonen des Dimethylallylrests ins Hochfeld verschoben vorgefunden wurden (3.15 bis 1.33 ppm). Diese Signale sprechen dafür, dass zwischen C-2‘ und C-3‘ nur noch eine Einfachbindung besteht. Die Nähe der olefinischen Doppelbindung zum Amino-Stickstoff in **28b** könnte in saurem Milieu, und möglicherweise während der nachfolgenden Aufbereitung - wobei während des Einengens am Rotationsverdampfer eine Temperatur von 37 °C nicht überschritten wurde - eine Verknüpfung unter Bildung eines sechsgliedrigen Ringes begünstigen. Ähnliche Reaktionen wurden bereits für aromatische Amine unter

Verwendung von Trifluormethansulfonsäure (Hilt *et al.,* 2005) und für prenylierte 4-Hydroxycoumarine (Yang *et al.,* 2008) beschrieben. Bei **28c** handelt es sich also wahrscheinlich um ein Umlagerungsprodukt von **28b**, das durch einen intramolekularen Ringschluss entstanden ist (Abbildung 3-59). Die Prenylierung von **28a** müsste demzufolge an Position C-7 stattgefunden haben.

Tabelle 3-28: Positive ESI-MS-Daten des enzymatischen Produkts (28b) und des Umlagerungsprodukts (28c).

Substanz	Summenformel	berechnet	gemessen	Abweichung [ppm]
28b	$C_{15}H_{17}NO$	228,1388 $[M+H]^+$	228,1375	- 5,7
28c	$C_{15}H_{17}NO$	246,1494 $[M+H+H_2O]^+$	246,1449	- 18,3

Tabelle 3-29: ^{1}H-NMR-Daten von 8-Amino-2-naphthol (28a), des enzymatischen Produkts (28b) und des Umlagerungsprodukts (28c).

Substanz			
	28a	**28b**	**28c**
Proton	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***	**δ_H, mult., *J***
1	7.21, d, 2.4	7.23, d, 2.5	7.18, d, 2.4
OH-2	- [a]	- [a]	- [a]
3	7.03, dd, 8.8, 2.4	7.05, dd, 9.1, 2.5	7.28, dd, 9.3, 2.4
4	7.63, d, 8.8	7.81, d, 9.1	8.11, d, 9.3
5	7.18, d, 8.2	6.89, d, 7.5	7.38, d, 7.6
6	7.04, dd, 8.2, 7.4	6.72, d, 7.5	7.21, d, 7.6
7	6.78, dd, 7.4, 1.1	-	-
NH-8	- [a]	- [a]	- [a]
1‘	-	3.60, d, 7.2	3.15, m
2‘	-	5.31, t sept, 7.0, 1.5	1.82, m
3‘	-	-	-
4‘	-	1.79, s	1.33, s
5‘	-	1.73, d, 1.0	1.33, s

^{1}H-NMR-Daten in CD_3OD, 500 MHz. Chemische Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, Kopplungskonstanten (*J*) in Hz. s: Singulett, d: Dublett, t: Triplett, sept: Septett, m: Multiplett. [a]: Signal nicht beobachtet.

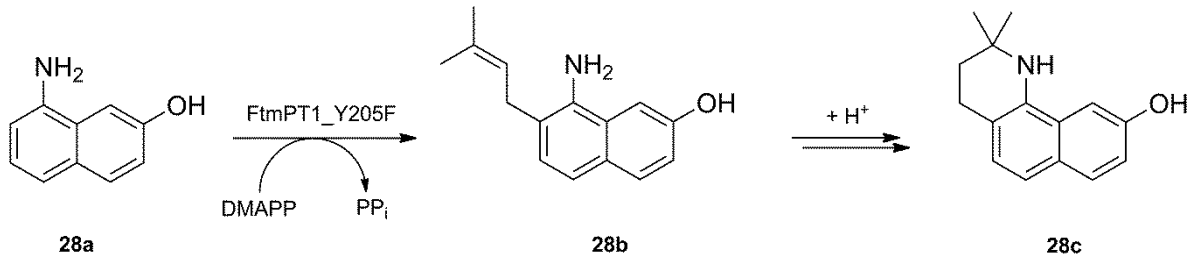


Abbildung 3-59: Prenylierung von 8-Amino-2-naphthol (28a) durch FtmPT1_Y205F und anschließende postulierte Umlagerung im sauren Milieu.

3.3.2.6 Sequenzanalysen und Herstellung mutierter Derivate von CdpC3PT und CTrpPT

Da G115 in FtmPT1 eine wichtige Rolle für die Prenylierung spielt, wurde ein Multiproteinsequenzvergleich mit anderen C-3-Prenyltransferasen und CTrpPT durchgeführt, um die entsprechenden Positionen in den jeweiligen Proteinsequenzen zu identifizieren (s. 6.11). Hier fällt auf, dass CdpC3PT und CdpNPT, deren Produkte wie das von FtmPT1_G115T eine *R*-Konfiguration an C-3 aufweisen, jeweils an der entsprechenden Position ein Alanin enthalten (Tabelle 3-30). Dagegen ist in AnaPT an dieser Position ein Glycin zu finden; die Produkte von AnaPT sind an C-3 *S*-konfiguriert. Daher wurde CdpC3PT für weitere Mutationsexperimente ausgewählt. A115 sollte in diesem Protein gegen Glycin und Threonin ausgetauscht werden und die Funktion der daraus resultierenden Derivate untersucht werden (Tabelle 3-31). Daneben sollte an CTrpPT mit der Mutation von G117 gegen Threonin überprüft werden, ob diese Aminosäure auch in anderen Prenyltransferasen eine wichtige Rolle spielt. Als Ausgangsplasmide für die zielgerichtete Mutagenese dienten pWY25 (*cdpC3PT* in pQE-60) (Yin *et al.,* 2010) und pHX21 (*cTrpPT* in pQE-70) (Zou *et al.,* 2010). In getrennten PCR-Experimenten wurden die Mutationen eingeführt und die erhaltenen Plasmide nach einem DpnI-Verdau zur Transformation von *E. coli* XL1-Blue MRF‘ verwendet. Für CdpC3PT_A115G und A115T konnte die erfolgreiche Mutagenese durch Sequenzierung der Plasmide pST15 und pST17 bestätigt werden. Für CTrpPT_G117T konnten nach wiederholten PCR-Versuchen nur Plasmide erhalten werden, die außerdem noch zusätzliche, zufällige Mutationen enthielten. Diese Plasmide wurden nicht weiter untersucht. pST115 und pST17 wurden zur Expression der mutierten Proteine in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ verwendet.

Tabelle 3-30: Übersicht über C-3-Prenyltransferasen und CTrpPT.

Protein	Aminosäure (entspr. G115 in FtmPT1)	Konfiguration der Produkte an C3*
FtmPT1_G115T	T115	*R*
AnaPT	G126	*S*
CdpC3PT	A115	*R*
CdpNPT	A131	*R*
CTrpPT	G117	-

*: Konfiguration des Hauptprodukts

Tabelle 3-31: Mittels zielgerichteter Mutagenese erzeugte und geplante Derivate von CdpC3PT und CTrpPT.

Mutation	Basenaustausch	Expressionskonstrukt
CdpC3PT_A115G	GCC → G**G**C	pST15
CdpC3PT_A115T	GCC → **A**CC	pST17
CTrpPT_G117T	GGC → **AC**C	-

Fette Buchstaben entsprechen veränderten Basen.

3.3.2.7 Überproduktion und Aufreinigung mutierter Derivate von CdpC3PT

Die mutierten Derivate von CdpC3PT wurden mithilfe der Plasmide pST15 und pST17 unter denselben Bedingungen überproduziert, die bereits für CdpC3PT beschrieben sind (Yin *et al.,* 2010). Nach einer Reinigung durch Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose wurden die Proteine jeweils durch SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert. Das theoretische Molekulargewicht der His_6-Fusionsproteine liegt bei 47,6 kDa. Nach SDS-PAGE konnten für CdpC3PT als auch die beiden mutierten Derivate Proteinbanden knapp oberhalb der 45 kDa-Bande des Proteingrößenstandards beobachtet werden (Abbildung 3-60). Durch die Reinigung wurden Ausbeuten von 1,8 mg für CdpC3PT, 0,8 mg für CdpC3PT_A115G und 0,6 mg für CdpC3PT_A115T je Liter Kultur erreicht.

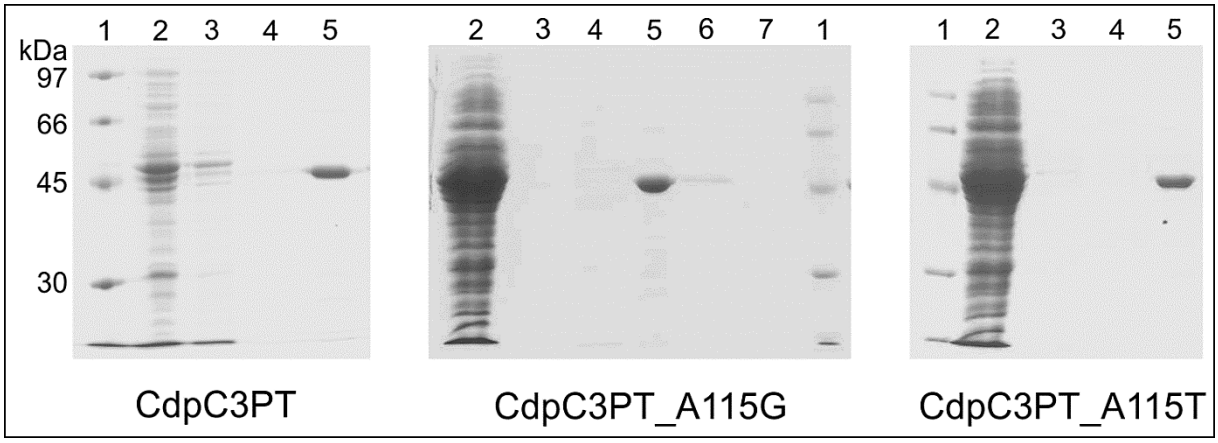


Abbildung 3-60: SDS-PAGE der Reinigung von CdpC3PT-His_6 und mutierten Derivaten. Das theoretische Gewicht der Proteine beträgt 47,6 kDa. Spur 1: Protein-Größenstandard. Spur 2: Durchflussfraktion. Spur 3: erste Waschfraktion. Spur 4: zweite Waschfraktion. Spur 5: erste Elutionsfraktion. Spur 6: zweite Elutionsfraktion. Spur 7: dritte Elutionsfraktion.

3.3.2.8 Aktivitätstests mutierter Derivate von CdpC3PT

CdpC3PT_A115G und CdpC3PT_A115T wurden mit acht cyclischen, Tryptophan-haltigen Dipeptiden auf ihre Aktivität hin getestet. Die Inkubationsansätze enthielten 50 mM Tris•HCl (pH 7,5), 5 mM $CaCl_2$, 1 mM Dipeptid, 2 mM DMAPP und 5 µg Protein. Die Inkubation fand für 16 h bei 37 °C statt. Identische Inkubationen mit CdpC3PT dienten als Vergleich. Nach der HPLC-Analyse konnten für beide mutierten Derivate lediglich eine verminderte Aktivität, aber keine Unterschiede in den Produkten festgestellt werden (Abbildung 3-61). So zeigte CdpC3PT_A115G mit *cyclo*-L-Leu-L-Trp (**13a**) den höchsten Umsatz mit einer relativen Aktivität von 42,5% verglichen mit dem Wildtyp, ebenso wie CdpC3PT_A115T mit 38,7% relativer Aktivität (Abbildung 3-62).

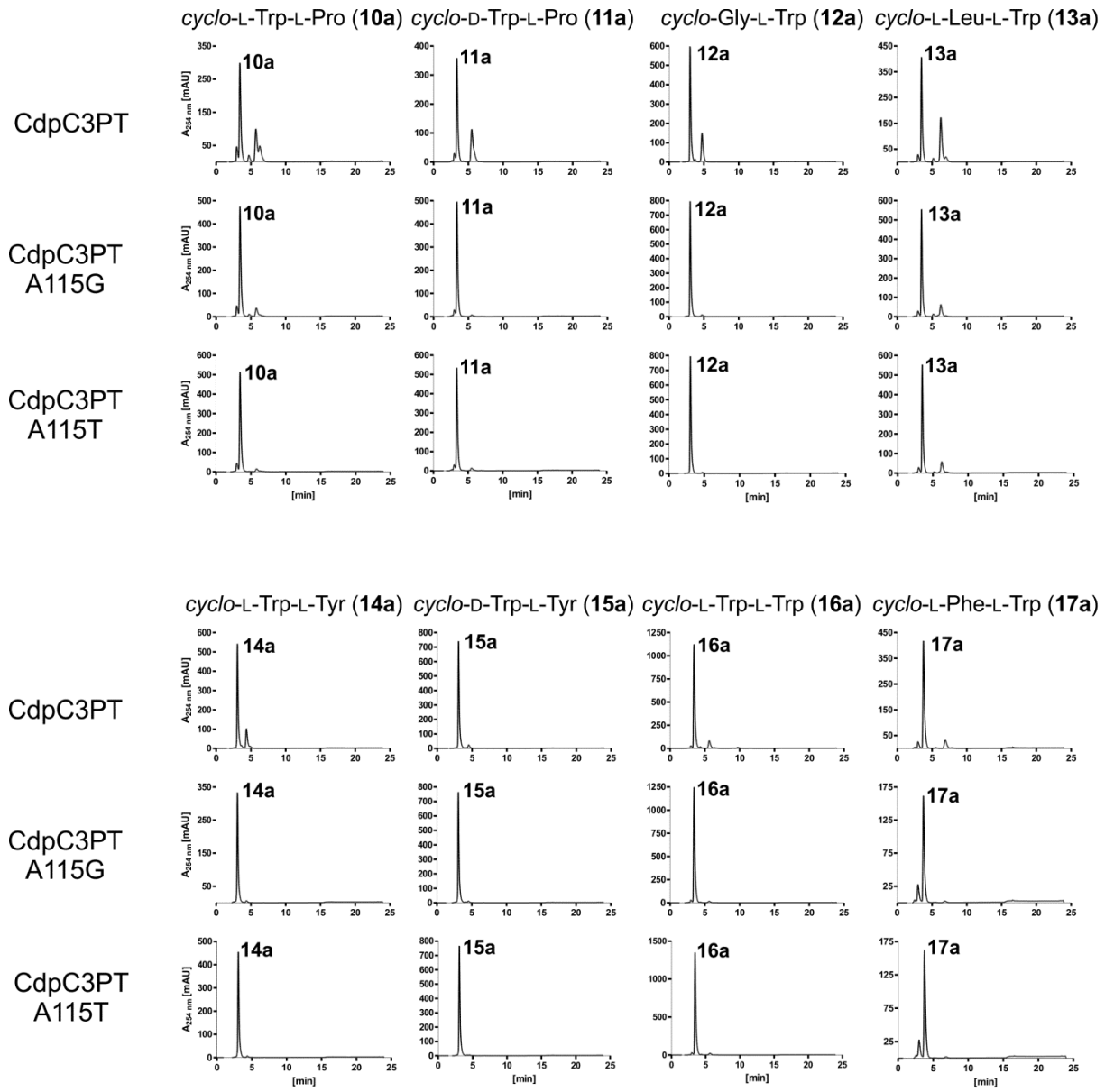


Abbildung 3-61: HPLC-Chromatogramme der Inkubationen von CdpC3PT und mutierten Derivaten mit tryptophanhaltigen cyclischen Dipeptiden. Die Reaktionsansätze wurden bei 37 °C für 16 h inkubiert.

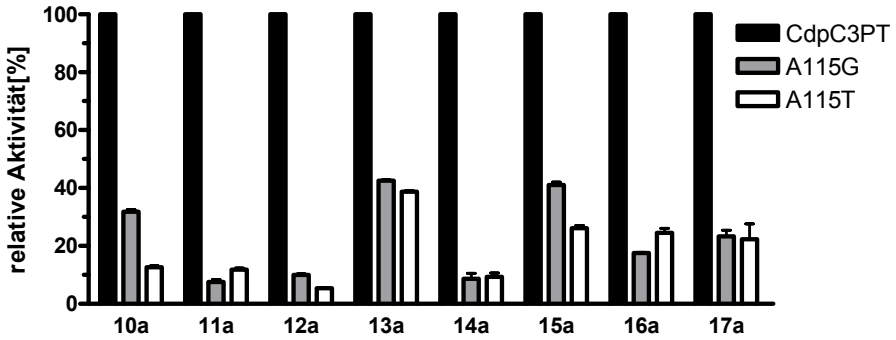


Abbildung 3-62: Relative Aktivität von CdpC3PT, CdpC3PT_A115G und CdpC3PT_A115T mit cyclischen Dipeptiden. Der Umsatz wurde über die Produktbildung bestimmt. Die für CdpC3PT bestimmte Aktivität wurde als 100% definiert.

4. Diskussion

4.1 Die Asterrichinon-Prenyltransferase AstPT aus *A.terreus*

In der vorliegenden Arbeit wurde das putative Prenyltransferasegen *astPT* (*ATEG_09980*) aus *A. terreus* DSM 1958 amplifiziert und mittels Expressionsvektor pQE-70 in *E. coli* XL1-Blue MRF‘ überproduziert. Dabei konnte eine durchschnittliche Ausbeute von 3 mg/l erreicht werden. Unter Verwendung von Asterrichinon D (AQ D, **1**) und DMAPP konnte der Transfer von Dimethylallyleinheiten auf die Positionen N-1 und C-2 von AQ D gezeigt werden (Abbildung 4-1). Jeweils zwei mono- und zwei diprenylierte Produkte konnten erfolgreich isoliert und deren Struktur aufgeklärt werden. Während die Produkte **2** und **4** bisher noch nicht beschrieben waren, konnten **3** und **5** bereits aus *A. terreus* isoliert werden (Arai *et al.,* 1981a; Yamamoto *et al.,* 1976b). Symmetrische, indolhaltige Substrate werden häufig an beiden analogen Positionen prenyliert, wie z. B. Fellutanine oder Amauromine (De Guzman *et al.,* 1992; Kozlovsky *et al.,* 2000; Mundt & Li 2013; Takase *et al.,* 1984).

Da unter den prenylierten Asterrichinonen auch eine Reihe asymmetrischer Verbindungen isoliert werden konnten (s. 1.4.2.), zeigte auch AstPT die interessante Eigenschaft, sein Substrat an verschiedenen Positionen zu prenylieren. Die bisher bekannte Bisindolylbenzochinon-PTase TdiB führt zwar auch zwei Dimethylallylreste an verschiedenen Positionen ein, nämlich revers an C-2 des Indolrings und regulär am Benzochinonring, allerdings erfolgt die zweite Prenylierung lediglich in einem Komplex mit den Enzymen TdiC und TdiE, da eine oxidoreduktive Umlagerung notwendig ist (Schneider *et al.,* 2008b).

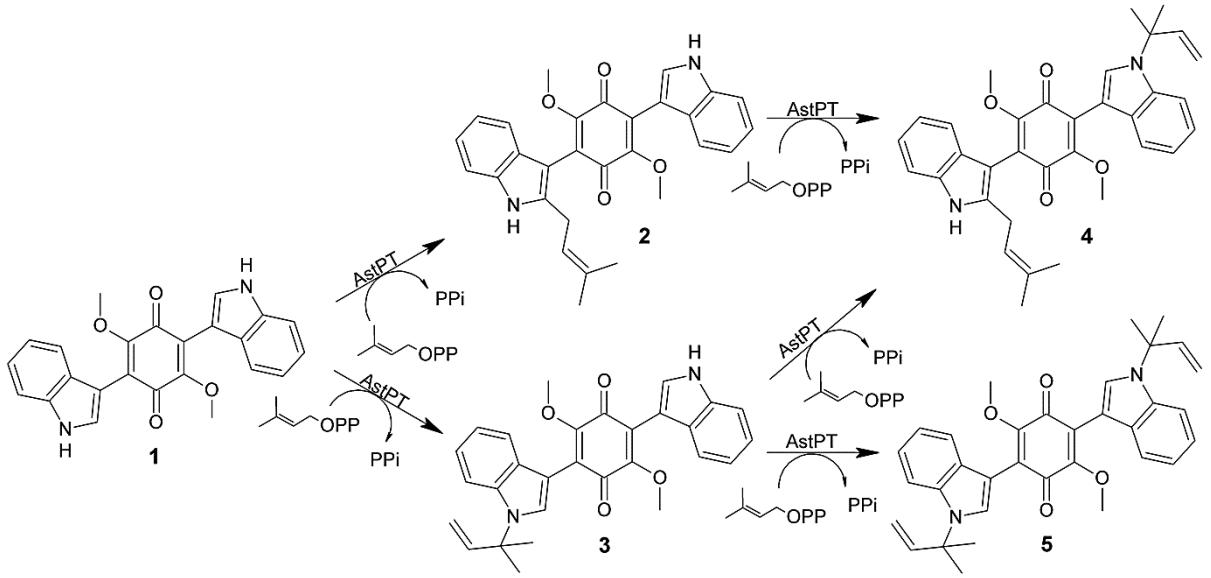


Abbildung 4-1: Von AstPT katalysierte Prenylierungen von Asterrichinon D.

AstPT zeigte keine Umsetzung mit den typischen Substraten von PTasen der DMATS-Superfamilie, wie den aromatischen Aminosäuren L-Tryptophan oder L-Tyrosin oder davon abgeleiteten cyclischen Dipeptiden. Unter Verwendung von vier Xanthonderivaten, die mindestens zwei Hydroxylgruppen enthielten, konnte eine Prenylierung sowohl mit DMAPP als auch mit GPP und FPP erreicht werden. Für alle erhaltenen Produkte konnte eine *O*-Prenylierung an den bevorzugten Positionen O-3, O-6 oder O-7 gezeigt werden. Die akzeptierten Substrate enthielten alle eine zusätzliche Hydroxylgruppe an Position 1, ein O-1-prenyliertes Produkt konnte allerdings nicht detektiert werden. Möglicherweise ist diese Position aufgrund einer sterischen Hinderung durch die Carbonylgruppe für eine Prenylierung nicht zugänglich. Außer Sterigmatocystin (Atalla *et al.,* 2003), einer Vorstufe der Aflatoxine, konnten aus *A. terreus* bisher keine Xanthonderivate isoliert werden; diese sind hauptsächlich aus anderen *Aspergillus*-Arten wie *A. nidulans* und *A. variecolor* bekannt (Masters & Bräse 2012).

Bei den Hydroxyxanthonen handelt es sich daher wahrscheinlich um unnatürliche Substrate von AstPT. Dies konnte auch durch die biochemische Charakterisierung des Enzyms bestätigt werden. Während für die Reaktion mit AQ D (**1**) die Michaelis-Konstante mit 463 µM und die Wechselzahl mit 0,16 s^{-1} bestimmt werden konnten, lagen die Werte für das am besten akzeptierte Hydroxyxanthonderivat 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (**6a**) jeweils bei 17,3 µM und 0,001 s^{-1}. Die Reaktion mit AQ D (**1**) verlief also 160-fach schneller. Interessanterweise war die Michaelis-Konstante mit **6a** als aromatisches Substrat für GPP (12,1 µM) niedriger als für DMAPP (97,3 µM) und die Wechselzahl doppelt so groß (0,002 statt 0,001 s^{-1}).

Das Bisindolylbenzochinon AQ D und die von AstPT akzeptierten Hydroxyxanthone weisen einige strukturelle Ähnlichkeiten auf. So sind die Moleküle größtenteils planar und besitzen zentrale Carbonylgruppen. Da die Sauerstofffunktionen des AQ D mit Methylgruppen blockiert sind, ist eine Prenylierung hier nicht möglich. Andererseits enthalten die Hydroxyxanthone keine aromatischen Stickstoffatome, die für eine Prenylierung in Frage kämen. Hier zeigt sich die hohe Flexibilität der DMATS-PTasen hinsichtlich des Prenyl-akzeptors. So konnten bereits mit der *O*-PTase SirD, deren natürliches Substrat L-Tyrosin ist, unter Verwendung von unnatürlichen Substraten, *N*-, *C*- und auch *S*-prenylierte Produkte erhalten werden (Kremer & Li 2010; Rudolf & Poulter 2013; Zou *et al.,* 2011). Hinweise auf die Ursachen dieser Flexibilität könnten Kristallstrukturen oder Sequenzvergleiche verschiedener PTasen liefern.

Zu diesem Zweck wurde die Aminosäuresequenz von AstPT mit denen von bereits kristallisierten Enzymen und zusätzlich mit denen von 7-DMATS, TdiB und XptB verglichen. Aminosäuren, die typischerweise an der Bindung des Diphosphatrests der Prenyldonoren beteiligt sind, wie Lysine, Arginine und Tyrosine, und in den Prenyltransferasen

hochkonserviert sind, waren auch in AstPT zu finden. Trotz der relativ geringen Sequenzidentitäten um 30% besitzen wahrscheinlich alle PTasen der DMATS-Superfamilie eine ähnliche *PT-barrel*-Struktur und nahezu identische Diphosphatbindemotive. Dagegen ist die Bindung der aromatischen Substrate unterschiedlich ausgebildet und Vorhersagen über die Substratspezifität, die Prenylierungsposition oder das Prenylierungsmuster lassen sich nach heutigem Kenntnisstand nicht treffen. Mithilfe von Kristallisationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass an der Bindung der aromatischen Substrate in mehreren Enzymen ein Glutamatrest beteiligt ist, der den Indolstickstoff stabilisiert und möglicherweise ein Proton abstrahiert (vgl. 3.3.1). Dieser Rest ist in vielen PTasen konserviert. TdiB enthält an dieser Stelle ein Aspartat, das aber die Funktion des Glutamats übernehmen kann, während in AstPT an dieser Position ein Asparagin zu finden ist. Eine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen und damit eine Stabilisierung des Indolstickstoffs wären aber dennoch möglich. Hier wäre es interessant zu untersuchen, wie sich Mutationen dieser Aminosäure auf die Aktivität von AstPT auswirken. Beispielsweise könnte eine Mutation von N81 zu Glutamat oder Aspartat die Aktivität von AstPT gegenüber AQ D erhöhen. Da die Xanthon-PTase XptB ebenfalls einen konservierten Lysinrest trägt, könnten ebenfalls die Unterschiede in der Umsetzung von Hydroxyxanthonen untersucht werden.

Die Tatsache, dass AstPT AQ D an den nebeneinander liegenden Positionen N-1 revers und C-2 regulär prenyliert, zeigt die Möglichkeit auf, dass das Indol gleichzeitig an beiden Positionen nukleophil angreifen kann (Abbildung 4-2). Dies wird auch durch die beiden mesomeren Grenzstrukturen des Carbeniumions begünstigt. Weil dabei das tertiäre Carbeniumion stabiler ist als das primäre, wird verständlich, weshalb die N-revers prenylierten Produkte bevorzugt gebildet wurden. Experimente mit FtmPT1 zeigten, dass

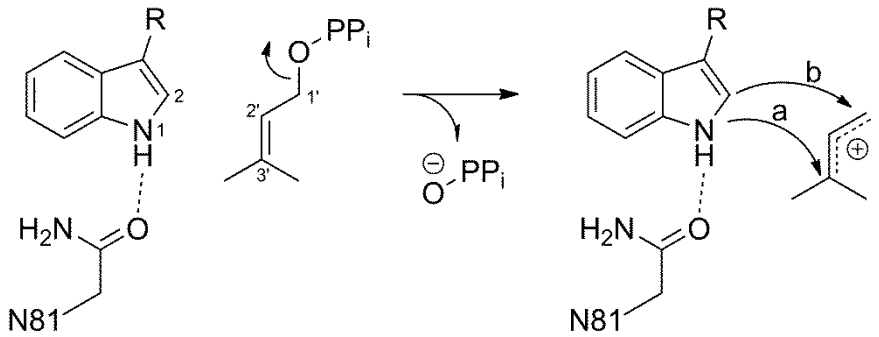


Abbildung 4-2: Möglicher Reaktionsmechanismus der reversen (a) und regulären (b) Prenylierung von Asterrichinon D (AQ D) durch AstPT. Das aromatische Substrat AQ D ist durch einen Indolrest dargestellt. Im Anschluss auf den nukleophilen Angriff des Indols wird ein Proton abgespalten und die Aromatizität wiederhergestellt. Auf eine mögliche Beteiligung von N81 an der Stabilisierung des Indols wurde aus Sequenzvergleichen mit anderen Prenyltransferasen geschlossen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist nur das Sauerstoffatom des Diphosphatrests (PP_i) explizit dargestellt.

verschiedene Prenylierungspositionen auch entstehen können, indem auf eine Prenylierung eine Umlagerung folgt (Chen *et al.,* 2012; Mahmoodi & Tanner 2013). Genauere Aussagen über den Reaktionsmechanismus könnten getroffen werden, sobald eine Kristallstruktur von AstPT verfügbar ist.

4.2 Die putative Prenyltransferase EAU39348 aus *A.terreus*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das putative Prenyltransferasegen *ATEG_00702* aus *A. terreus* FGSC A1156 amplifiziert und mittels Expressionsvektor pHIS8 in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS überproduziert. Durch eine Reinigungsstrategie mit zweifacher Affinitätschromatographie an Nickel und Cobalt konnte das Protein EAU39348 mit einer Ausbeute von 0,1 mg/l aufgereinigt werden. *ATEG_00702* ist im Genom von *A. terreus* in einem Cluster lokalisiert, das außerdem Gene für ein NRPS-ähnliches Protein (*ATEG_00700*), eine Dehydrogenase (*ATEG_00701*) und eine *O*-Methyltransferase (*ATEG_00703*) enthält. Da die entsprechenden Proteine hohe Ähnlichkeiten zu den Proteinen des Tdi-Clusters aus *A. nidulans* aufweisen, wurde vermutet, dass das Cluster für die Biosynthese von prenylierten Bisindolylbenzochinonen in *A. terreus* verantwortlich sein könnte.

Wie bereits mit TdiB konnte in Anwesenheit von DMAPP und Asterrichinon D (AQ D) keine Produktbildung beobachtet werden. Zu einem späteren Zeitpunkt dieser Arbeit konnte von Frau Lena Ludwig eine geringe Menge des vermuteten natürlichen Substrates Didemethylasterrichinon D (DDAQ D) synthetisiert werden. Die HPLC-Analytik der Inkubationen mit DDAQ D zeigte, dass EAU39348 zur Bildung von mindestens zwei Produkten führt. Der Unterschied in der Retentionszeit der Produkte betrug mindestens 3 min; diese Differenz konnte bereits bei den mono- und diprenylierten Produkten aus den Reaktionen von AstPT mit AQ D beobachtet werden. Es könnte sich folglich ebenfalls um eine zweistufige Reaktion handeln.

Für weitere Untersuchungen mit EAU39348 sollte versucht werden, die Expressionsbedingungen weiter zu optimieren und das Enzym in größeren Mengen aufzureinigen. Der längere, zweistufige Reinigungsprozess scheint sich nicht negativ auf die Enzymaktivität auszuwirken. Die erhaltenen Resultate deuten aber darauf hin, dass es sich bei EAU39348, ähnlich wie bei TdiB, um eine spezifische PTase für unmethylierte Bisindolylbenzochinone handelt.

4.3 Untersuchung von Sekundärmetabolitprofilen von Kulturen aus *Aspergillus terreus* DSM 1958 und A1156 und Vergleich der Prenyltransferasen AstPT und EAU39348

Die beiden homologen, putativen Prenyltransferasegene *ATEG_09980* (*astPT*) und *ATEG_00702* wurden aus der gDNA zweier unterschiedlicher Stämme von A. terreus gewonnen. Während die Sequenz von AstPT aus *A. terreus* DSM 1958 amplifiziert werden konnte, wurde *ATEG_00702* (EAU39348) nur aus gDNA von *A. terreus* A1156 amplifiziert. Kulturextrakte beider Stämme wurden daraufhin mittels LC/MS auf die Produktion von prenylierten und unprenylierten Bisindolylbenzochinonen untersucht, um mögliche Auswirkungen auf das Sekundärmetabolitprofil zu finden.

Massen von Ionen, die AQ D bzw. mono- und diprenylierten Derivaten von AQ D entsprechen, konnten nur im Extrakt des Mycels von *A. terreus* DSM 1958 detektiert werden. Andererseits konnten Massen von Derivaten von DDAQ D in Extrakten beider Stämme wiedergefunden werden. So waren Massen entsprechend prenyliertem DDAQ D sowohl in Extrakten vom Mycel von *A. terreus* A1156 als auch vom Kulturfiltrat von *A. terreus* DSM 1958 zu detektieren. Demzufolge waren beide Stämme in der Lage, Derivate von DDAQ D, d. h. unmethylierte Bisindolylbenzochinone zu produzieren, wohingegen methylierte Abkömmlinge nur in *A. terreus* DSM 1958 zu finden waren. Dies könnte bedeuten, dass die Amplifikation von *ATEG_00702* aus *A. terreus* DSM 1958 schlicht nicht erfolgreich war. Dass TdiB aus *A. nidulans* AQ D nicht umsetzen konnte, legt den Schluss nah, dass dieses Enzym nur Substrate mit freien Hydroxylgruppen am Benzochinonring akzeptiert. Dies scheint auch auf EAU39348 zuzutreffen, während AstPT offenbar für die Prenylierung von methylierten Bisindolylbenzochinonen verantwortlich ist. Beide Gruppen von Sekundärmetaboliten konnten aus *A. terreus* isoliert werden (Arai *et al.,* 1981a; Mocek *et al.,* 1996), korrespondierende Massen konnten wie bereits beschrieben für beide Gruppen durch LC/MS-Analysen nachgewiesen werden.

Durch Knockout-Experimente konnte kürzlich gezeigt werden, dass das TdiA-Homolog EAU39346 für die Dimerisierung von Indolpyruvat in *A. terreus* verantwortlich ist (Guo *et al.,* 2013). Hinweise auf die Synthese von AQ D konnten durch die Arbeiten von Arai und Yamamoto erbracht werden, die Methylierungsaktivität unter Verwendung von DDAQ D als Substrat für Enzymrohextrakte aus *A. terreus* aufzeigten (Arai & Yamamoto 1990). Eine Charakterisierung von EAU39349 könnte Aufschluss darüber bringen, ob es sich wie vorhergesagt um eine *O*-Methyltransferase handelt, die durch die Methylierung von DDAQ D AQ D als Substrat für AstPT bereitstellt (Abbildung 4-3). Die Prenylierung von AQ D durch AstPT wurde mit einer Wechselzahl von 0,16 s^{-1} als recht langsam charakterisiert. Dies könnte zu einer Akkumulation von AQ D und im weiteren Verlauf auch von DDAQ D führen, falls die putative *O*-Methyltransferase EAU39349 eine Produkthemmung durch AQ D erfährt.

Das daraus resultierende erhöhte Aufkommen von DDAQ D könnte sich in einer vermehrten Bildung von unmethylierten, prenylierten Bisindolylbenzochinonen wiederspiegeln. Diese Produkte wären für den Pilz besonders vorteilhaft, da für sie stärkere biologische Wirksamkeiten, z. B. antibiotische Aktivitäten nachgewiesen werden konnten (Brewer *et al.,* 1970; Meiler & Taylor 1971).

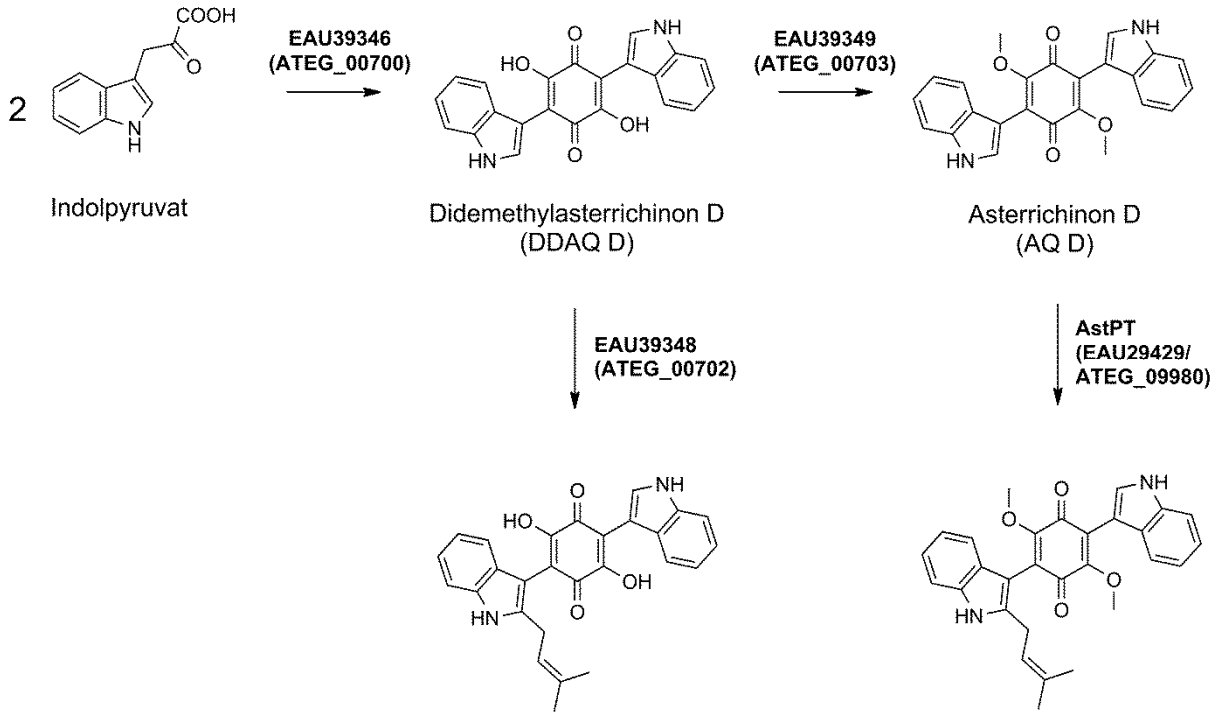


Abbildung 4-3: Putative Reaktionswege der Biosynthese von prenylierten Bisindolylbenzochinonen in *Aspergillus terreus*.

4.4 Die putative Prenyltransferase EAQ91749 aus *C. globosum*

Im Genom von *C. globosum* konnten vier geclusterte Gene identifiziert werden, die für Proteine codieren, die eine hohe Homologie zu Proteinen des Tdi-Clusters aus *A. nidulans* aufweisen. Dabei handelt es sich um eine putative aromatische PTase (*CHGG_03684*), eine Dehydrogenase (*CHGG_03685*), eine Aminotransferase (*CHGG_03686*) und ein NRPS-ähnliches Enzym (*CHGG_03687*). Die Ähnlichkeit zu den Tdi-Proteinen lässt den Schluss zu, dass die Proteine aus *C. globosum* für die Biosynthese von Bisindolylbenzochinonen wie dem Cochliodinol (Brewer *et al.,* 1968) verantwortlich sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde das putative Prenyltransferasegen *CHGG_03684* aus *C. globosum* DSM 1962 amplifiziert und in mehrere Vektoren zur Überproduktion in verschiedenen Expressionssystemen kloniert. Die Überproduktion wurde in *E. coli* in T5- und T7-Promotorsystemen mithilfe der Stämme XL1-Blue MRF‘, M15 [pREP4], SG13009

[pREP4], BL21 (DE3) pLysS, Rosetta 2 (DE3) pLysS, SoluBL21™, ArcticExpress RIL und ArcticExpress (DE3) RIL als Fusionsproteine mit N-terminalem His_8-*tag*, C-terminalem His_6-*tag* und N-terminalem GST-*tag* durchgeführt. Meist erfolgte eine starke Produktion von unlöslichem Protein in Form von Einschlusskörpern. Zur Gewinnung von löslichem Protein wurden die Kultivierungs- und Expressionsbedingungen verändert, um die Expressionsrate zu minimieren, z. B. durch niedrige IPTG-Konzentrationen oder niedrige Expressionstemperaturen, was aber wiederum nicht erfolgreich war. Um den Einfluss auf die Löslichkeit zu untersuchen, wurde das Protein ohne jegliche Fusions-*tags* exprimiert, doch auch dies führte nur zur Bildung von Einschlusskörpern. Die Koexpression mit den Chaperonen Cpn60 und Cpn10 (Ferrer *et al.,* 2003), die die Bildung von korrekt gefaltetem Protein begünstigen sollen, lieferte kein lösliches Protein. Da die Überproduktion im eukaryotischen System in *S. cerevisiae* INVSc1 ebenfalls nicht erfolgreich war, wurde versucht, lösliches Protein aus den Einschlusskörpern zu isolieren. Dabei wurden eine Methode zur milden Solubilisierung mit N-Laurylsarcosin (Frankel *et al.,* 1991) sowie die Solubilisierung mit 8 M Harnstoff (Fischer *et al.,* 1993) mit anschließender Dialyse zur Renaturierung getestet. Durch die Harnstoff-Solubilisierung konnte nach Ni-NTA-Reinigung mit 0,5 mg Protein je Liter Kultur die höchste Ausbeute erreicht werden. Diese Proteinfraktion wurde auf die Aktivität gegenüber AQ D hin getestet; eine Produktbildung war allerdings nicht zu beobachten.

Die mangelnde Aktivität des Proteins könnte in den drastischen Solubilisierungsbedingungen, im anschließenden Reinigungsprozess oder in der Proteinsequenz an sich begründet sein. Die in dieser Arbeit verwendete Sequenz von EAQ91749 stammte aus Datenbanken des *Broad Institute*. Eigene Analysen mit FGENESH 2.6 zeigten kürzlich, dass für das zweite Exon wahrscheinlich eine zu kurze Sequenz vorhergesagt wurde und dass auch alternative Sequenzen möglich sind. Im direkten Vergleich mit der Bisindolylbenzochinon-PTase TdiB aus *A. nidulans* und den beiden Homologen aus *A. terreus*, AstPT und EAU39348, fällt auf, dass *CHGG_03684* für ein kleineres Protein (401 Aminosäuren statt 419 bzw. 424 Aminosäuren) codiert. Ein längeres zweites Exon würde zu einer höheren Identität im Vergleich zu TdiB führen. Dies sollte in Zukunft überprüft werden.

4.5 Die putativen, nichtribosomalen Peptidsynthetase-ähnlichen Enzymen aus *Aspergillus terreus* und *Chaetomium globosum*

NRPS-ähnliche Enzyme sind einmodulare Enzyme bestehend aus A-T-TE-Domänen, die die Dimerisierung von α-Ketosäuren katalysieren. Sechs Gene, die für solche Enzyme codieren, konnten im Genom von *A. terreus* identifiziert werden, während in *C. globosum* zwei Gene zu finden sind. Da beide Ascomyceten für die Produktion von Bisindolylbenzochinonen bekannt sind (Brewer *et al.,* 1968; Yamamoto *et al.,* 1976b), die

durch NRPS-ähnliche Enzyme gebildet werden (Schneider *et al.,* 2007), ist es sehr wahrscheinlich, dass einige dieser Enzyme auch an der Produktion von Bisindolylbenzochinonen in *A. terreus* und *C. globosum* beteiligt sind. Um Hinweise auf ihre Substrate zu erhalten, wurden die Aminosäuresequenzen von insgesamt sieben putativen NRPS-ähnlichen Enzymen mithilfe des NRPSpredictor2 (Röttig *et al.,* 2011) untersucht. Für fünf Enzyme konnten NRPS-Codes extrahiert werden, die allerdings keine klare Vorhersage auf mögliche Substrate lieferten. Vergleiche der Aminosäuresequenzen mit denen von TdiA und GrsA zeigten, dass in allen untersuchten Enzymen (außer in EAU36089) der NRPS-Code mit V-A-E/H beginnt, was mit der Aktivierung von aromatischen α-Ketosäuren korreliert (Kalb *et al.,* 2013). Aromatische α-Ketosäuren können also als Substrate für die NRPS-ähnlichen Enzyme in *A. terreus* und *C. globosum* vermutet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten vier putative NRPS-ähnliche Proteine mitsamt der jeweils eigenen Promotor- und Terminatorsequenzen aus gDNA von *A. terreus* bzw. *C. globosum* amplifiziert werden. Anschließend konnten *ATEG_02004*, *ATEG_03563* und *CHGG_03687* erfolgreich in den Vektor pJW24 kloniert werden. Nach Protoplastierung von *A. niger* AB 1.13 und PEG-vermittelter Transformation wurden für das Konstrukt pST38 (*ATEG_02004*) drei Transformanten erhalten (*A. niger* ST01-ST03), deren Uridin-prototrophie durch mehrfache Selektion auf uridinfreiem Medium gezeigt wurde. Zusätzlich konnte die erfolgreiche Integration der Gensequenz von *ATEG_02004* mittels PCR nachgewiesen werden. In anschließenden Experimenten wurden die Transformanten in GMM kultiviert und mittels HPLC und LC/MS auf Unterschiede in der Produktion von Sekundärmetaboliten im Vergleich zu *A. niger* AB 1.13 untersucht. Hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transformanten und AB 1.13, bzw. alle Produkte der Transformanten konnten auch in Extrakten von AB 1.13 wiedergefunden werden. Hinweise auf Aspulvinon E, an dessen Synthese EAU36966 (*ATEG_02004*) beteiligt sein soll (Guo *et al.,* 2013), oder entsprechende prenylierte Derivate konnten nicht gefunden werden. Daher sollte der Expressionsstatus des Genes beispielsweise mittel Northern Blot untersucht werden, um herauszufinden, ob tatsächlich eine Transkription stattfindet. Zusätzlich könnte der eigene Promotor gegen einen bereits charakterisierten, stärkeren Promotor wie den konstitutiven *gpdA*-Promotor (Punt *et al.,* 1990) ausgetauscht werden, um höhere Expressionsraten zu erreichen. Bei nachfolgenden Protoplastierungsversuchen sollte die Sporenkonzentration während der Keimung verringert werden, da eine zu hohe Konidiendichte möglicherweise die Keimung behindert, wie bereits für den Ascomyceten *Magnaporthe grisea* beobachtet (Hegde & Kolattukudy 1997). Dadurch könnten auch die Transformationsbedingungen für die übrigen Konstrukte pST28 (*CHGG_03687*) und pST33 (*ATEG_03563*) verbessert und höhere Transformationsraten erhalten werden.

4.6 Zielgerichtete Mutagenese von FtmPT1 zur Identifizierung der am Prenyltransfer beteiligten Aminosäuren

Kokristallisationsexperimente mit rekombinant hergestelltem FtmPT1 und Brevianamid F sowie dem Substratanalogon DMSPP lieferten einen ersten Einblick in das aktive Zentrum des Enzyms. In vorausgehenden Untersuchungen konnten bereits durch Mutageneseexperimente mit K201 und K294 zwei Aminosäuren identifiziert werden, die maßgeblich an der Katalyse beteiligt sind (Stec *et al.,* 2008). Da PTasen der DMATS-Superfamilie ihre Reaktionen auch in Abwesenheit von Kationen katalysieren, muss die Stabilisierung des Diphosphatrestes durch basische Aminosäuren vermittelt werden. Dies ist aufgrund der räumlichen Nähe von K201 und K294 zum Diphosphat von DMSPP sehr wahrscheinlich. Während die an der Bindung der Prenyldiphosphate beteiligten Aminosäuren in vielen PTasen der DMATS-Superfamilie konserviert sind, treten bei den an der Bindung der aromatischen Substrate involvierten Aminosäuren Unterschiede auf. Um den Einfluss der im aktiven Zentrum gefundenen Aminosäuren auf die katalytische Aktivität von FtmPT1 zu untersuchen, wurden jene ausgewählt und mutiert, die deutlich unterschiedlich von den ensprechenden Aminosäuren in FgaPT2 waren. Der Austausch des Glutamatrestes E102 durch Glutamin führte zu einem vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass E102 nicht nur an einer Stabilisierung des Indolstickstoffs über Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt ist (Abbildung 4-4), sondern möglicherweise auch im Verlauf der Reaktion als Akzeptor des bei der Prenylierung (oder des beim Ringschluss im Fall von FtmPT1_G115T) substituierten Protons fungiert. Durch die Erhöhung der Elektronendichte ist der Aufbau der Wasserstoffbrücken essentiell für die Reaktion, da dies die Reaktivität des Indolrings erhöht und einen elektrophilen Angriff durch das Prenylkation nach Abspaltung des Diphosphates ermöglicht. Als alternativer Protonenakzeptor könnte H279 eine Rolle spielen, das sich allerdings in näherer Nachbarschaft zur Carbonylgruppe an Position 16 von Brevianamid F befindet. Die Substitution von H279 durch Phenylalanin reduzierte die Aktivität auf 83,1% im Vergleich zu FtmPT1, was verdeutlicht, dass H279 nicht direkt an der Katalyse beteiligt ist.

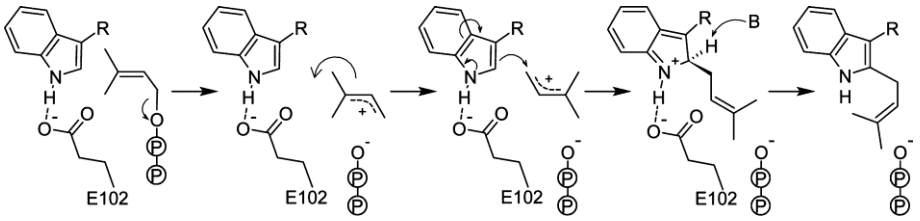


Abbildung 4-4: Postulierter Mechanismus für die Prenylierung von Brevianamid F durch FtmPT1 (Jost *et al.,* 2010). Nach Abspaltung des Diphosphats rotiert der Dimethylallylrest, um eine reguläre Prenylierung an C-2 zu ermöglichen. Dies wird durch die geringe Elektronendichte von DMSPP in der Kristallstruktur bekräftigt, was auf eine verstärkte Beweglichkeit des Dimethylallylkations im aktiven Zentrum hindeutet.

Eine Gegenüberstellung der Kristallstrukturen von FtmPT1 und FgaPT2 zeigte den wahrscheinlich wichtigsten Unterschied zwischen den beiden aktiven Zentren auf: an die Stelle des Threonins T102 in FgaPT2 tritt das Glycin G115 in FtmPT1. Durch Glycin wird nicht nur die Bindungstasche von FtmPT1 im Vergleich zu FgaPT2 vergrößert, sondern auch ein polarer Rest durch einen unpolaren ersetzt. Dementsprechend führte die Mutation G115T wie erwartet zu einem fast vollständigen Verlust der Aktivität in Bezug auf die Produktion von Tryprostatin B (0,4%), der Verbrauch an Brevianamid F wurde allerdings nur auf 14,4% gesenkt. Die Mutation zu Threonin führte zu einer Veränderung der Prenylierungsposition von C-2 nach C-3. Zusätzlich wurde statt einer regulären eine reverse Prenylierung eingeführt. Im Verlauf der Reaktion von FtmPT1_G115T mit Brevianamid F fand außerdem ein Ringschluss zwischen den Atomen C-2 und N-12 statt. Das resultierende Produkt zeigte also eine Struktur, die bisher nur von Produkten der C-3- PTase CdpC3PT bekannt war (Yin *et al.,* 2010). Während G115T einen starken Einfluss auf die Katalyse zeigte, war die Aktivität von FtmPT1_G115A mit 92,7% relativem Umsatz nur leicht vermindert und die Produkte identisch mit denen von FtmPT1. Dies deutet darauf hin, dass die zusätzliche Methylgruppe von dem Enzym ausgeglichen werden kann. Die Substitution von G115 durch größere, unpolare Aminosäuren wie Leucin oder Isoleucin führte dagegen zu einem vollständigen Verlust der Aktivität des Enzyms. Vermutlich kommt es durch die größeren Reste zu einer starken Verschiebung von Brevianamid F in der Bindungstasche, so dass eine Stabilisierung durch E102 verhindert wird. FtmPT1_G115L zeigte nach einer Inkubationszeit von 16 h dennoch eine minimale Aktivität von 1%. Das entstehende Produkt war dabei deutlich verschieden von Tryprostatin B, konnte aber aufgrund der geringen Umsetzung nicht strukturell aufgeklärt werden. Die Beobachtungen mit G115T und G115L verdeutlichen allerdings, dass es sich bei G115 um einen wichtigen Faktor in der Festlegung der Regioselektivität in FtmPT1 handelt.

Unter den sechs Tyrosinresten, die im aktiven Zentrum von FtmPT1 zu finden sind, sind vier (Y203, Y296, Y382 und Y450) in die Stabilisierung des Diphosphats involviert, während Y205 und Y435 die Diketopiperazinfunktion des aromatischen Substrats koordinieren. Dies konnte durch die Mutation von Y205 zu Phenylalanin bestätigt werden, was die Aktivität des Enzyms nur mäßig minderte (84,5% im Vergleich zu FtmPT1).

In der Zwischenzeit konnten auch die Kristallstrukturen von AnaPT (Yu *et al.,* 2013) und CdpNPT (Schuller *et al.,* 2012) aufgeklärt werden. Beide Enzyme zeigten ebenfalls die für Prenyltransferasen der DMATS-Superfamilie typische *PT barrel*-Struktur aus fünf aufeinanderfolgenden $\alpha\beta\beta\alpha$-Einheiten. Die Strukturen bestätigten ein weiteres Mal, dass die an der Koordinierung der Diphosphatreste der Prenyldonoren beteiligten Aminosäuren hoch konserviert sind. Eine wichtige Aminosäure ist der Glutamatrest, der in vielen Prenyltransferasen konserviert ist (s. Anhang 6.7) und in den bisher erhaltenen Strukturen in

der Nähe des indolhaltigen Substrates gefunden wurde: E89 in FgaPT2, E102 in FtmPT1, E116 in CdpNPT und E111 in AnaPT. Nur in TdiB (D67), AstPT (N81) und EAU39348 (N80) ist dieser Rest ausgetauscht, wobei der Aspartatrest in TdiB eine ähnliche Funktion erfüllen kann wie das Glutamat. Auch das Asparagin in AstPT und EAU39348 kann als Wasserstoffakzeptor fungieren. Dagegen konnten viele der übrigen hochkonservierten Aminosäuren nicht mit den aktiven Zentren in Verbindung gebracht werden.

4.7 Zielgerichtete Mutagenese von Prenyltransferasen zur Veränderung der Substrat- und Regiospezifität

Enzyme spielen als Biokatalysatoren in der industriellen Anwendung eine immer größere Rolle. So können beispielsweise aufwendige, mehrstufige chemische Syntheseverfahren durch eine einstufige Enzymreaktion ersetzt werden, gleichzeitig können chirale Verbindungen häufig nur mithilfe von Enzymen ökonomisch sinnvoll synthetisiert werden (Festel *et al.,* 2004). Viele aromatische PTasen aus Ascomyceten zeichnen sich durch ihre breite Spezifität hinsichtlich ihrer aromatischen Substrate aus und stehen als mögliche Werkzeuge für die chemoenzymatische Synthese im Fokus der Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe (Li 2010). Zusätzlich sind diese Enzyme besonders interessant im Hinblick auf die Synthese von pharmakologischen aktiven Substanzen, da die Einführung eines Prenylrests häufig die biologische Aktivität der Grundsubstanz erhöht (Wollinsky *et al.,* 2012a). Bereits 1985 wurden erste Versuche unternommen, die Aktivität von Enzymen mittels zielgerichteter Mutagenese zu optimieren (Estell *et al.,* 1985) und bis heute werden auf zahlreiche Weisen maßgeschneiderte Enzyme optimiert und industriell eingesetzt (Anobom *et al.,* 2014; Bornscheuer *et al.,* 2012; Strohmeier *et al.,* 2011; Windle *et al.,* 2014). Im Rahmen der Aufklärung der Kristallstruktur von FtmPT1 konnte die essentielle Rolle von Glycin 115 in der Determinierung der Prenylierungsposition aufgezeigt werden (vgl. 4.6). FtmPT1_G115T katalysierte nicht nur in Brevianamid F, sondern wahrscheinlich auch in sieben weiteren tryptophanhaltigen, cyclischen Dipeptiden statt einer regulären C-2-Prenylierung, eine reverse C-3-Prenylierung unter Entstehung eines Hexahydropyrroloindols. Für zwei Produkte, C-3-revers prenyliertes *cyclo*-L-Leu-L-Trp und *cyclo*-L-Trp-L-Trp, konnten mittels MS- und ^{1}H-NMR-Analysen die Strukturen nachgewiesen werden. Die übrigen Produkte waren aufgrund der geringeren Umsetzung einer Strukturaufklärung nicht zugänglich, die ähnlichen UV-Spektren sprachen jedoch für eine C-3-Prenylierung. In FtmPT1 war es also möglich, durch die gerichtete Mutation einer Aminosäure die Orientierung des Prenylrests zu verändern.

Aufgrund der Bedeutung dieser Aminosäure für den Reaktionsmechanismus wurde die entsprechende Position in CdpC3PT ebenfalls mutiert. Die erhaltenen Derivate

CdpC3PT_A115G und CdpC3PT_A115T zeigten allerdings ein häufiges Problem der Mutageneseexperimente: ihre Aktivität gegenüber cyclischen Dipeptiden war vermindert (maximal 42,5 bzw. 38,7% der Wildtypaktivität), ohne sich weitergehend auf die Regiospezifität auszuwirken.

Daneben zeigte FtmPT1_Y205F eine erhöhte Akzeptanz von Hydroxynaphthalin-derivaten. Von elf getesteten Substraten wurden neun durch FtmPT1_Y205F umgesetzt (acht durch FtmPT1), für sechs davon konnte der Umsatz im Vergleich zu FtmPT1 mindestens verdoppelt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass auch pilzliche PTasen durch wenige strukturelle Änderungen in ihrer Substrat- und Regiospezifität weiterentwickelt werden können. So konnte kürzlich mithilfe zielgerichteter Mutagenese die Aktivität der Phenazin-PTase aus der CloQ/NphB-Gruppe EpzP aus *Streptomyces cinnamonensis* erhöht werden (Zocher *et al.,* 2012). Grundlagen dafür sind ausreichende Informationen über das aktive Zentrum und die Wechselwirkungen zwischen Enzymen und Substraten.

5. Referenzen

Akashi, T., Sasaki, K., Aoki, T., Ayabe, S. & Yazaki, K. (2009). Molecular cloning and characterization of a cDNA for pterocarpan 4-dimethylallyltransferase catalyzing the key prenylation step in the biosynthesis of glyceollin, a soybean phytoalexin. *Plant Physiol.* **149**, 683-693.

Alberts, A. W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V. et al. (1980). Mevinolin: a highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **77**, 3957-3961.

Ali, H., Ries, M. I., Nijland, J. G., Lankhorst, P. P., Hankemeier, T., Bovenberg, R. A. L., Vreeken, R. J. & Driessen, A. J. M. (2013). A Branched Biosynthetic Pathway Is Involved in Production of Roquefortine and Related Compounds in *Penicillium chrysogenum*. *PLoS ONE* **8**, e65328.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**, 403-410.

Alvi, K. A., Pu, H., Luche, M., Rice, A., App, H., McMahon, G., Dare, H. & Margolis, B. (1999). Asterriquinones produced by *Aspergillus candidus* inhibit binding of the Grb-2 adapter to phosphorylated EGF receptor tyrosine kinase. *Journal of Antibiotics* **52**, 215-223.

Ames, B. D. & Walsh, C. T. (2010). Anthranilate-activating modules from fungal nonribosomal peptide assembly lines. *Biochemistry* **49**, 3351-3365.

Andersen, B., Frisvad, J. C., Søndergaard, I., Rasmussen, I. S. & Larsen, L. S. (2011). Associations between Fungal Species and Water-Damaged Building Materials. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**, 4180-4188.

Anobom, C. D., Pinheiro, A. S., De-Andrade, R. A., Aguieiras, E. C. G., Andrade, G. C., Moura, M. V., Almeida, R. V. & Freire, D. M. (2014). From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases. *Biomed. Res. Int.* **2014**, Article ID 684506.

Arabatzis, M. & Velegraki, A. (2013). Sexual reproduction in the opportunistic human pathogen *Aspergillus terreus*. *Mycologia* **105**, 71-79.

Arai, K. (1984). *Aspergillus terreus*. *Dissertation Universität Kyoto (Japan)*.

Arai, K., Kimura, K., Mushiroda, T. & Yamamoto, Y. (1989). Structures of fructigenines A and B, new alkaloids isolated from *Penicillium fructigenum* Takeuchi. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 2937-2939.

Arai, K., Masuda, K., Kiriyama, N., Nitta, K., Yamamoto, Y. & Shimizu, S. (1981a). Metabolic products of *Aspergillus terreus*. IV. Metabolites of the strain IFO 8835. (2). The isolation and chemical structure of indolyl benzoquinone pigments. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 961-969.

Arai, K., Sato, S., Shimizu, S., Nitta, K. & Yamamoto, Y. (1981b). Metabolic products of *Aspergillus terreus*. VII. Astechrome: an iron-containing metabolite of the strain IFO 6123. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 1510-1517.

Arai, K. & Yamamoto, Y. (1990). Metabolic products of *Aspergillus terreus*. X. Biosynthesis of asterriquinones. *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 2929-2932.

Archer, D. B., Connerton, I. F. & MacKenzie, D. A. (2008). Filamentous fungi for production of food additives and processing aids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **111**, 99-147.

Ashby, M. N., Kutsunai, S. Y., Ackerman, S., Tzagoloff, A. & Edwards, P. A. (1992). COQ2 is a candidate for the structural gene encoding *para*-hydroxybenzoate:polyprenyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 4128-4136.

Atalla, M. M., Hassanein, N. M., El-Beih, A. A. & Youssef, Y. A. (2003). Mycotoxin production in wheat grains by different Aspergilli in relation to different relative humidities and storage periods. *Nahrung* **47**, 6-10.

Balibar, C. J., Howard-Jones, A. R. & Walsh, C. T. (2007). Terrequinone A biosynthesis through L-tryptophan oxidation, dimerization and bisprenylation. *Nat. Chem. Biol.* **3**, 584-592.

Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* **28**, 235-242.

Birch, A. J., Blance, G. E., David, S. & Smith, H. (1961). Studies in relation to biosynthesis. XXIV. Some remarks on the structure of echinuline. *J. Chem. Soc.* 3128-3131.

Birnboim, H. C. & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.

Blackwell, J. R. & Horgan, R. (1991). A novel strategy for production of a highly expressed recombinant protein in an active form. *FEBS Lett.* **295**, 10-12.

Boettger, D. & Hertweck, C. (2013). Molecular diversity sculpted by fungal PKS-NRPS hybrids. *Chembiochem.* **14**, 28-42.

Bok, J. W., Hoffmeister, D., Maggio-Hall, L. A., Murillo, R., Glasner, J. D. & Keller, N. P. (2006). Genomic mining for *Aspergillus* natural products. *Chem. Biol.* **13**, 31-37.

Bok, J. W. & Keller, N. P. (2004). LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus* spp. *Eukaryot. Cell* **3**, 527-535.

Bonitz, T., Alva, V., Saleh, O., Lupas, A. N. & Heide, L. (2011). Evolutionary relationships of microbial aromatic prenyltransferases. *PLoS One* **6**, e27336.

Bornscheuer, U. T., Huisman, G. W., Kazlauskas, R. J., Lutz, S., Moore, J. C. & Robins, K. (2012). Engineering the third wave of biocatalysis. *Nature* **485**, 185-194.

Boruta, T. & Bizukojc, M. (2014). Culture-based and sequence-based insights into biosynthesis of secondary metabolites by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. *J. Biotechnol.* **175**, 53-62.

Botta, B., Monache, G. D., Menendez, P. & Boffi, A. (2005a). Novel prenyltransferase enzymes as a tool for flavonoid prenylation. *Trends Pharmacol. Sci.* **26**, 606-608.

Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle, M. G. (2005b). Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* **12**, 717-739.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.

Brandt, W., Brauer, L., Gunnewich, N., Kufka, J. et al. (2009). Molecular and structural basis of metabolic diversity mediated by prenyldiphosphate converting enzymes. *Phytochemistry* **70**, 1758-1775.

Bräuer, L., Brandt, W., Schulze, D., Zakharova, S. & Wessjohann, L. (2008). A structural model of the membrane-bound aromatic prenyltransferase UbiA from *E. coli*. *Chembiochem* **9**, 982-992.

Brewer, D., Duncan, J. M., Jerram, W. A., Leach, C. K. et al. (1972). Ovine ill-thrift in Nova Scotia. 5. The production and toxicology of chetomin, a metabolite of *Chaetomium* spp. *Can. J.Microbiol.* **18**, 1129-1137.

Brewer, D., Jen, W. C., Jones, G. A. & Taylor, A. (1984). The antibacterial activity of some naturally occurring 2,5-dihydroxy-1,4-benzoquinones. *Can. J. Microbiol.* **30**, 1068-1072.

Brewer, D., Jerram, W. A., Meiler, D. & Taylor, A. (1970). The toxicity of cochliodinol, an antibiotic metabolite of *Chaetomium* spp. *Can. J. Microbiol.* **16**, 433-440.

Brewer, D., Jerram, W. A. & Taylor, A. (1968). Production of cochliodinol and a related metabolite by *Chaetomium* species. *Can. J. Microbiol.* **14**, 861-866.

Bushley, K. E., Ripoll, D. R. & Turgeon, B. G. (2008). Module evolution and substrate specificity of fungal nonribosomal peptide synthetases involved in siderophore biosynthesis. *BMC. Evol. Biol* **8**, 328.

Calvo, A. M., Bok, J., Brooks, W. & Keller, N. P. (2004). veA is required for toxin and sclerotial production in *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 4733-4739.

Cane, D. E., Walsh, C. T. & Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.

Chen, J., Morita, H., Wakimoto, T., Mori, T., Noguchi, H. & Abe, I. (2012). Prenylation of a nonaromatic carbon of indolylbutenone by a fungal indole prenyltransferase. *Org. Lett.* **14**, 3080-3083.

Cheng, W. & Li, W. (2014). Structural insights into ubiquinone biosynthesis in membranes. *Science* **343**, 878-881.

Chooi, Y. H., Fang, J., Liu, H., Filler, S. G., Wang, P. & Tang, Y. (2013). Genome mining of a prenylated and immunosuppressive polyketide from pathogenic fungi. *Org. Lett.* **15**, 780-783.

Chooi, Y. H., Wang, P., Fang, J., Li, Y., Wu, K., Wang, P. & Tang, Y. (2012). Discovery and characterization of a group of fungal polycyclic polyketide prenyltransferases. *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 9428-9437.

Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M. A. & Brick, P. (1997). Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *EMBO J.* **16**, 4174-4183.

De Guzman, F. S., Bruss, D. R., Rippentrop, J. M., Gloer, K. B. & Gloer, J. B. (1994). Ochrindoles A-D: new bis-indolyl benzenoids from the sclerotia of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3519. *J. Nat. Prod.* **57**, 634-639.

De Guzman, F. S., Gloer, J. B., Wicklow , D. T. & Dowd, P. F. (1992). New diketopiperazine metabolites from the sclerotia of *Aspergillus ochraceus*. *J. Nat. Prod.* **55**, 931-939.

de Souza Moreira, L. R., de Carvalho Campos, M., de Siqueira, P. H. V. M., Silva, L. P., Ricart, C. A. O., Martins, P. A., Queiroz, R. M. L. & Filho, E. X. F. (2013). Two b-xylanases from *Aspergillus terreus*: Characterization and influence of phenolic compounds on xylanase activity. *Fungal Genet. Biol.* **60**, 46-52.

Ding, Y., Wet, J. R., Cavalcoli, J., Li, S. et al. (2010). Genome-based characterization of two prenylation steps in the assembly of the stephacidin and notoamide anticancer agents in a marine-derived *Aspergillus* sp. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 12733-12740.

Ding, Y., Williams, R. M. & Sherman, D. H. (2008). Molecular analysis of a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Malbranchea aurantiaca*. *J. Biol. Chem.* **283**, 16068-16076.

Domsch, K. H., Gams, W. & Anderson, T. H. (2007) *Compendium of Soil Fungi*. Eching: IHW-Verlag.

Dyer, P. S. & O'Gorman, C. M. (2011). A fungal sexual revolution: *Aspergillus* and *Penicillium* show the way. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 649-654.

Edwards, D. J. & Gerwick, W. H. (2004). Lyngbyatoxin biosynthesis: sequence of biosynthetic gene cluster and identification of a novel aromatic prenyltransferase. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11432-11433.

Endo, A., Kuroda, M. & Tanzawa, K. (1976). Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Letters* **72**, 323-326.

Estell, D. A., Graycar, T. P. & Wells, J. A. (1985). Engineering an enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. *J. Biol. Chem.* **260**, 6518-6521.

Farnsworth, C. C., Seabra, M. C., Ericsson, L. H., Gelb, M. H. & Glomset, J. A. (1994). Rab geranylgeranyl transferase catalyzes the geranylgeranylation of adjacent cysteines in the small GTPases Rab1A, Rab3A, and Rab5A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11963-11967.

Ferrer, M., Chernikova, T. N., Yakimov, M. M., Golyshin, P. N. & Timmis, K. N. (2003). Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. *Nat. Biotechnol.* **21**, 1266-1267.

Festel, G., Knöll, J., Götz, H. & Zinke, H. (2004). Der Einfluss der Biotechnologie auf Produktionsverfahren in der Chemieindustrie. *Chemie Ingenieur Technik* **76**, 307-312.

Finking, R. & Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**, 453-488.

Fischer, B., Sumner, I. & Goodenough, P. (1993). Isolation, renaturation, and formation of disulfide bonds of eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies. *Biotechnol. Bioeng.* **41**, 3-13.

Flieger, M., Wurst, M. & Shelby, R. (1997). Ergot alkaloids--sources, structures and analytical methods. *Folia Microbiol. (Praha)* **42**, 3-30.

Fogle, M. R., Douglas, D. R., Jumper, C. A. & Straus, D. C. (2007). Growth and mycotoxin production by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia* **164**, 49-56.

Forseth, R. R., Amaike, S., Schwenk, D., Affeldt, K. J., Hoffmeister, D., Schroeder, F. C. & Keller, N. P. (2013). Homologous NRPS-like gene clusters mediate redundant small-molecule biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* **52**, 1590-1594.

Franck, B. & Gehrken, H. P. (1980). Citreoviridins from *Aspergillus terreus*. *Angew. Chem Int. Ed Engl.* **19**, 461-462.

Frankel, S., Sohn, R. & Leinwand, L. (1991). The use of sarkosyl in generating soluble protein after bacterial expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 1192-1196.

Fredenhagen, A., Petersen, F., Tintelnot-Blomley, M., Rosel, J., Mett, H. & Hug, P. (1997). Semicochliodinol A and B: inhibitors of HIV-1 protease and EGF-R protein tyrosine kinase related to asterriquinones produced by the fungus *Chrysosporium merdarium*. *J. Antibiot.* **50**, 395-401.

Fulmer, G. R., Miller, A. J. M., Sherden, N. H., Gottlieb, H. E., Nudelman, A., Stoltz, B. M., Bercaw, J. E. & Goldberg, K. I. (2010). NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics* **29**, 2176-2179.

Gao, H., Guo, W., Wang, Q., Zhang, L., Zhu, M., Zhu, T., Gu, Q., Wang, W. & Li, D. (2013). Aspulvinones from a mangrove rhizosphere soil-derived fungus *Aspergillus terreus* Gwq-48 with anti-influenza A viral (H1N1) activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*

Gao, X., Haynes, S. W., Ames, B. D., Wang, P., Vien, L. P., Walsh, C. T. & Tang, Y. (2012). Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. *Nat. Chem. Biol.* **8**, 823-830.

Geiser, D. M., Gueidan, C., Miadlikowska, J., Lutzoni, F. et al. (2006). Eurotiomycetes: Eurotiomycetidae and Chaetothyriomycetidae. *Mycologia* **98**, 1053-1064.

Gelb, M. H., Brunsveld, L., Hrycyna, C. A., Michaelis, S., Tamanoi, F., Van Voorhis, W. C. & Waldmann, H. (2006). Therapeutic intervention based on protein prenylation and associated modifications. *Nat. Chem. Biol.* **2**, 518-528.

Gelb, M. H., Scholten, J. D. & Sebolt-Leopold, J. S. (1998). Protein prenylation: from discovery to prospects for cancer treatment. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 40-48.

Grover, P. K., Shah, G. D. & Shah, R. C. (1955). Xanthones. Part IV. A new synthesis of hydroxyxanthones and hydroxybenzophenones. *J. Chem Soc.* 3982-3985.

Grundmann, A., Kuznetsova, T., Afiyatullov, S. S. & Li, S.-M. (2008). FtmPT2, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*, catalyses the last step in the biosynthesis of fumitremorgin B. *Chembiochem* **9**, 2059-2063.

Grundmann, A. & Li, S.-M. (2005). Overproduction, purification and characterization of FtmPT1, a brevianamide F prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 2199-2207.

Guo, C. J., Knox, B. P., Chiang, Y. M., Lo, H. C., Sanchez, J. F., Lee, K. H., Oakley, B. R., Bruno, K. S. & Wang, C. C. (2012). Molecular genetic characterization of a cluster in *A. terreus* for biosynthesis of the meroterpenoid terretonin. *Org. Lett.* **14**, 5684-5687.

Guo, C. J., Knox, B. P., Sanchez, J. F., Chiang, Y. M., Bruno, K. S. & Wang, C. C. C. (2013). Application of an efficient gene targeting system linking secondary metabolites to their biosynthetic genes in *Aspergillus terreus*. *Org. Lett.* 3562-3565.

Guo, R. T., Ko, T. P., Chen, A. P. C., Kuo, C. J., Wang, A. H. J. & Liang, P. H. (2005). Crystal Structures of Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase in Complex with Magnesium, Isopentenyl Pyrophosphate, and Farnesyl Thiopyrophosphate: ROLES OF THE METAL ION AND CONSERVED RESIDUES IN CATALYSIS. *J. Biol. Chem.* **280**, 20762-20774.

Haagen, Y., Glück, K., Fay, K., Kammerer, B., Gust, B. & Heide, L. (2006). A gene cluster for prenylated naphthoquinone and prenylated phenazine biosynthesis in *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Chembiochem.* **7**, 2016-2027.

Haritakun, R., Rachtawee, P., Chanthaket, R., Boonyuen, N. & Isaka, M. (2010). Butyrolactones from the Fungus *Aspergillus terreus* BCC 4651. *Chem. Pharm. Bull.* **58**, 1545-1548.

Haug-Schifferdecker, E., Arican, D., Brueckner, R. & Heide, L. (2010). A new group of aromatic prenyltransferases in fungi, catalyzing a 2,7-dihydroxynaphthalene dimethylallyltransferase reaction. *J. Biol. Chem.* **285**, 16487-16494.

Hawksworth, D. L. (2001). The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycol. Res.* **105**, 1422-1432.

Haynes, S. W., Gao, X., Tang, Y. & Walsh, C. T. (2013). Complexity generation in fungal peptidyl alkaloid biosynthesis: A two-enzyme pathway to the hexacyclic MDR export pump inhibitor ardeemin. *ACS Chem.Biol.* **8**, 741-748.

He, J., Wijeratne, E. M. K., Bashyal, B. P., Zhan, J. et al. (2004). Cytotoxic and other metabolites of *Aspergillus* inhabiting the rhizosphere of Sonoran desert plants. *J. Nat. Prod.* **67**, 1985-1991.

Hegde, Y. & Kolattukudy, P. E. (1997). Cuticular waxes relieve self-inhibition of germination and appressorium formation by the conidia of *Magnaporthe grisea*. *Physiol. Mol. Plant P.* **51**, 75-84.

Heide, L. (2009). Prenyl transfer to aromatic substrates: genetics and enzymology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **13**, 171-179.

Hibbett, D. S., Binder, M., Bischoff, J. F., Blackwell, M. et al. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* **111**, 509-547.

Hilt, G., Hess, W. & Schmidt, F. (2005). Dihydroaromatic Boronic Esters as Building Blocks for the Synthesis of Phenanthrenes and Phenanthridines. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 2526-2533.

Hof, H., Dörries, R. & Geginat, G. (2009) *Medizinische Mikrobiologie: Immunologie, Virologie, Bakteriologie, Mykologie, Parasitologie, Klinische Infektiologie, Hygiene*. Stuttgart: Thieme Verlagsgruppe.

IUPAC-IUB Joint Commission on Biochemical Nomenclature (1984). Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides. *Pure & Appl. Chem.* **56**, 595-624.

Jerram, W. A., McInnes, A. G., Maass, W. S. G., Smith, D. G., Taylor, A. & Walter, J. A. (1975). Chemistry of cochliodinol, a metabolite of *Chaetomium* species. *Can. J. Chem.* **53**, 727-737.

Jez, J. M., Ferrer, J. L., Bowman, M. E., Dixon, R. A. & Noel, J. P. (2000). Dissection of malonyl-coenzyme A decarboxylation from polyketide formation in the reaction mechanism of a plant polyketide synthase. *Biochemistry* **39**, 890-902.

Jones, M. G. (2007). The first filamentous fungal genome sequences: *Aspergillus* leads the way for essential everyday resources or dusty museum specimens? *Microbiology* **153**, 1-6.

Jost, M., Zocher, G., Tarcz, S., Matuschek, M., Xie, X., Li, S.-M. & Stehle, T. (2010). Structure-function analysis of an enzymatic prenyl transfer reaction identifies a reaction chamber with modifiable specificity. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 17849-17858.

Kaji, A., Iwata, T., Kiriyama, N., Nomura, M. & Miyamoto, K. (1998a). Studies on the cytotoxicity of asterriquinone derivatives. *J. Antibiot.* **51**, 235-238.

Kaji, A., Iwata, T., Kiriyama, N., Wakusawa, S. & Miyamoto, K. (1994). Four new metabolites of *Aspergillus terreus*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 1682-1684.

Kaji, A., Kimura, K., Teranishi, M., Kiriyama, N., Nomura, M. & Miyamoto, K. (1998b). Preparation and structure-activity relationships of novel asterriquinone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **46**, 1325-1329.

Kaji, A., Saito, R., Nomura, M., Miyamoto, K. & Kiriyama, N. (1997). Mechanism of the cytotoxicity of asterriquinone, a metabolite of *Aspergillus terreus*. *Anticancer Res* **17**, 3675-3679.

Kalb, D., Lackner, G. & Hoffmeister, D. (2013). Fungal peptide synthetases: an update on functions and specificity signatures. *Fungal Biol. Rev.* **27**, 43-50.

Kato, N., Suzuki, H., Okumura, H., Takahashi, S. & Osada, H. (2013). A Point Mutation in *ftmD* Blocks the Fumitremorgin Biosynthetic Pathway in *Aspergillus fumigatus* Strain Af293. *Biosci. Biotech. Bioch.* **77**, 1061-1067.

Kato, N., Suzuki, H., Takagi, H., Asami, Y. et al. (2009). Identification of cytochrome P450s required for fumitremorgin biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **10**, 920-928.

Kelly, S. M. & Price, N. C. (2000). The Use of Circular Dichroism in the Investigation of Protein Structure and Function. *Curr. Protein Pept. Sc.* **1**, 349-384.

Khaldi, N., Seifuddin, F. T., Turner, G., Haft, D., Nierman, W. C., Wolfe, K. H. & Fedorova, N. D. (2010). SMURF: Genomic mapping of fungal secondary metabolite clusters. *Fungal. Genet. Biol.* **47**, 736-741.

Kim, D. M., Lee, M. H., Suh, M. K., Ha, G. Y., Kim, H. & Choi, J. S. (2013). Onychomycosis Caused by *Chaetomium globosum*. *Ann. Dermatol.* **25**, 232-236.

Kirk, P. M., Cannon, P. F. & Winter, D. W. (2008) *Dictionary of the Fungi*. Wallingford: CABI Publishing.

Klement, T. & Büchs, J. (2013). Itaconic acid - A biotechnological process in change. *Bioresource Technol.* **135**, 422-431.

Kozlovsky, A. G., Vinokurova, N. G., Adanin, V. M., Burkhardt, G., Dahse, H. M. & Gräfe, U. (2000). New diketopiperazine alkaloids from *Penicillium fellutanum*. *J. Nat. Prod.* **63**, 698-700.

Krätzschmar, J., Krause, M. & Marahiel, M. A. (1989). Gramicidin S biosynthesis operon containing the structural genes grsA and grsB has an open reading frame encoding a protein homologous to fatty acid thioesterases. *J. Bacteriol.* **171**, 5422-5429.

Kremer, A. & Li, S.-M. (2010). A tyrosine *O*-prenyltransferase catalyses the first pathway-specific step in the biosynthesis of sirodesmin PL. *Microbiology* **156**, 278-286.

Kremer, A., Westrich, L. & Li, S.-M. (2007). A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* **153**, 3409-3416.

Kück, U., Nowrousian, M., Hoff, B. & Engh, I. (2009) *Schimmelpilze: Lebensweise, Nutzen, Schaden, Bekämpfung*. Berlin: Springer-Verlag.

Kumano, T., Richard, S. B., Noel, J. P., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2008). Chemoenzymatic syntheses of prenylated aromatic small molecules using *Streptomyces* prenyltransferases with relaxed substrate specificities. *Bioorg. Med. Chem.* **16**, 8117-8126.

Kumano, T., Tomita, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2010). Functional characterization of the promiscuous prenyltransferase responsible for furaquinocin biosynthesis: identification of a physiological polyketide substrate and its prenylated reaction products. *J. Biol. Chem.* **285**, 39663-39671.

Kunze, B., Höfle, G. & Reichenbach, H. (1987). The aurachins, new quinoline antibiotics from myxobacteria: production, physico-chemical and biological properties. *J. Antibiot.* **40**, 258-265.

Kupfahl, C., Michalka, A., Lass-Flörl, C., Fischer, G., Haase, G., Ruppert, T., Geginat, G. & Hof, H. (2008). Gliotoxin production by clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* strains. *Int. J. Med. Microbiol.* **298**, 319-327.

Kuzuyama, T., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2005). Structural basis for the promiscuous biosynthetic prenylation of aromatic natural products. *Nature* **435**, 983-987.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

Lee, S. L., Floss, H. G. & Heinstein, P. (1976). Purification and properties of dimethylallylpyrophosphate:tryptophan dimethylallyl transferase, the first enzyme of ergot alkaloid biosynthesis in *Claviceps*. sp. SD 58. *Arch. Biochem. Biophys.* **177**, 84-94.

Li, G. Y., Li, B. G., Yang, T., Yin, J. H., Qi, H. Y., Liu, G. Y. & Zhang, G. L. (2005). Sesterterpenoids, terretonins A-D, and an alkaloid, asterrelenin, from *Aspergillus terreus*. *J. Nat. Prod.* **68**, 1243-1246.

Li, S.-M. (2009). Applications of dimethylallyltryptophan synthases and other indole prenyltransferases for structural modification of natural products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **84**, 631-639.

Li, S.-M. (2010). Prenylated indole derivatives from fungi: structure diversity, biological activities, biosynthesis and chemoenzymatic synthesis. *Nat. Prod. Rep.* **27**, 57-78.

Li, S.-M. (2011). Genome mining and biosynthesis of fumitremorgin-type alkaloids in ascomycetes. *J. Antibiot.* **64**, 45-49.

Liang, P. H., Ko, T. P. & Wang, A. H. (2002). Structure, mechanism and function of prenyltransferases. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3339-3354.

Liebhold, M. & Li, S.-M. (2013). Regiospecific benzylation of tryptophan and derivatives catalyzed by a fungal dimethylallyl transferase. *Org. Lett.* **15**, 5834-5837.

Liebhold, M., Xie, X. & Li, S.-M. (2012). Expansion of enzymatic Friedel-Crafts alkylation on indoles: Acceptance of unnatural beta-unsaturated allyl diphospates by dimethylallyl-tryptophan synthases. *Org. Lett.* **14**, 4884-4885.

Liebhold, M., Xie, X. & Li, S.-M. (2013). Breaking cyclic dipeptide prenyltransferase regioselectivity by unnatural alkyl donors. *Org. Lett.* **15**, 3062-3065.

Ling, K. H., Yang, C. K. & Peng, F. T. (1979). Territrems, tremorgenic mycotoxins of *Aspergillus terreus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 355-357.

Liu, X. & Walsh, C. T. (2009). Characterization of cyclo-acetoacetyl-L-tryptophan dimethylallyltransferase in cyclopiazonic acid biosynthesis: substrate promiscuity and site directed mutagenesis studies. *Biochemistry* **48**, 11032-11044.

Mahmoodi, N. & Tanner, M. E. (2013). Potential rearrangements in the reaction catalyzed by the indole prenyltransferase FtmPT1. *Chembiochem.* **14**, 2029-2037.

Maiya, S., Grundmann, A., Li, S.-M. & Turner, G. (2006). The fumitremorgin gene cluster of *Aspergillus fumigatus*: identification of a gene encoding brevianamide F synthetase. *Chembiochem.* **7**, 1062-1069.

Marahiel, M. A., Stachelhaus, T. & Mootz, H. D. (1997). Modular peptide synthetases involved in nonribosomal peptide synthesis. *Chem. Rev.* **97**, 2651-2674.

Markert, A., Steffan, N., Ploss, K., Hellwig, S., Steiner, U., Drewke, C., Li, S.-M., Boland, W. & Leistner, E. (2008). Biosynthesis and accumulation of ergoline alkaloids in a mutualistic association between *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) and a Clavicipitalean fungus. *Plant Physiol.* **147**, 296-305.

Masters, K.-S. & Bräse, S. (2012). Xanthones from fungi, lichens, and bacteria: The natural products and their synthesis. *Chem. Rev.* **112**, 3717-3776.

Mattern, I. E., Noort, J. M., Berg, P., Archer, D. B., Roberts, I. N. & Hondel, C. A. M. J. (1992a). Isolation and characterization of mutants of *Aspergillus niger* deficient in extracellular proteases. *Mol. Gen. Genet.* **234**, 332-336.

Matuschek, M. (2012). Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen zur Biosynthese von Mykotoxinen aus Ascomyceten. *Dissertation Universität Marburg*.

May, J. J., Kessler, N., Marahiel, M. A. & Stubbs, M. T. (2002). Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 12120-12125.

Meiler, D. & Taylor, A. (1971). Effect of cochliodinol, a metabolite of *Chaetomium cochliodes*, on the respiration of microspores of *Fusarium oxysporum*. *Can. J. Microbiol.* **17**, 83-86.

Melzer, M. & Heide, L. (1994). Characterization of polyprenyldiphosphate: 4-hydroxybenzoate polyprenyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* **1212**, 93-102.

Metzger, U., Keller, S., Stevenson, C. E., Heide, L. & Lawson, D. M. (2010). Structure and mechanism of the magnesium-independent aromatic prenyltransferase CloQ from the clorobiocin biosynthetic pathway. *J. Mol. Biol.* **404**, 611-626.

Metzger, U., Schall, C., Zocher, G., Unsöld, I., Stec, E., Li, S.-M., Heide, L. & Stehle, T. (2009). The structure of dimethylallyl tryptophan synthase reveals a common architecture of aromatic prenyltransferases in fungi and bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **106**, 14309-14314.

Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi - Progress, obstacles and future trends. *Biotechnol. Adv.* **26**, 177-185.

Misiek, M., Braesel, J. & Hoffmeister, D. (2011). Characterisation of the ArmA adenylation domain implies a more diverse secondary metabolism in the genus *Armillaria*. *Fungal Biol.* **115**, 775-781.

Mocek, U., Schultz, L., Buchan, T., Baek, C., Fretto, L., Nzerem, J., Sehl, L. & Sinha, U. (1996). Isolation and structure elucidation of five new asterriquinones from *Aspergillus*, *Humicola* and *Botryotrichum* species. *J. Antibiot.* **49**, 854-859.

Mootz, H. D., Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. (2002). Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem* **3**, 490-504.

Mundt, K. & Li, S.-M. (2013). CdpC2PT, a reverse prenyltransferase from *Neosartorya fischeri* with distinct substrate preference from known C2-prenyltransferases. *Microbiology* **159**, 2169-2179.

Mundt, K., Wollinsky, B., Ruan, H. L., Zhu, T. & Li, S.-M. (2012). Identification of the verruculogen prenyltransferase FtmPT3 by a combination of chemical, bioinformatic and biochemical approaches. *Chembiochem* **13**, 2583-2592.

Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and Function of Microbial Iron Transport Compounds. *J. Biol. Chem.* **270**, 26723-26726.

Noike, M., Liu, C., Ono, Y., Hamano, Y., Toyomasu, T., Sassa, T., Kato, N. & Dairi, T. (2012). An enzyme catalyzing O-prenylation of the glucose moiety of fusicoccin A, a diterpene glucoside produced by the fungus *Phomopsis amygdali*. *Chembiochem* **13**, 566-573.

O'Leary, M. A., Hanson, J. R. & Yeoh, B. L. (1984). The structure and biosynthesis of hinnuliquinone, a pigment from *Nodulisporium hinnuleum*. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1* 567-569.

Oganesyan, N., Ankoudinova, I., Kim, S. H. & Kim, R. (2007). Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expres. Purif.* **52**, 280-285.

Ogura, K. & Koyama, T. (1998). Enzymatic aspects of isoprenoid chain elongation. *Chem. Rev.* **98**, 1263-1276.

Ohara, K., Muroya, A., Fukushima, N. & Yazaki, K. (2009). Functional characterization of LePGT1, a membrane-bound prenyltransferase involved in the geranylation of p-hydroxybenzoic acid. *Biochem. J.* **421**, 231-241.

Ono, K., Nakane, H., Shimizu, S. & Koshimura, S. (1991). Inhibition of HIV-reverse transcriptase activity by asterriquinone and its analogues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174**, 56-62.

Osmani, S. A. & Mirabito, P. M. (2004). The early impact of genetics on our understanding of cell cycle regulation in *Aspergillus nidulans*. *Fungal Genet. Biol.* **41**, 401-410.

Ozaki, T., Mishima, S., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2009). NovQ is a prenyltransferase capable of catalyzing the addition of a dimethylallyl group to both phenylpropanoids and flavonoids. *J. Antibiot. (Tokyo)* **62**, 385-392.

Ozaki, T., Nishiyama, M. & Kuzuyama, T. (2013). Novel tryptophan metabolism by a potential gene cluster that is widely distributed among actinomycetes. *J. Biol. Chem.* **288**, 9946-9956.

Pan, J. J., Yang, L. W. & Liang, P. H. (2000). Effect of Site-Directed Mutagenesis of the Conserved Aspartate and Glutamate on *E. coli* Undecaprenyl Pyrophosphate Synthase Catalysis. *Biochemistry* **39**, 13856-13861.

Parameswaran, N. & Liese, W. (1972). Wandstrukturen der Perithecium-Haarhyphen von *Chaetomium globosum*. *Arch. Microbiol.* **86**, 225-229.

Park, J. H., Choi, G. J., Jang, K. S., Lim, H. K., Kim, H. T., Cho, K. Y. & Kim, J. C. (2005). Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **252**, 309-313.

Pirrung, M. C., Deng, L., Li, Z. & Park, K. (2002). Synthesis of 2,5-dihydroxy-3-(indol-3-yl)benzoquinones by acid-catalyzed condensation of indoles with 2,5-dichlorobenzoquinone. *J. Org. Chem.* **67**, 8374-8388.

Pirrung, M. C., Liu, Y., Deng, L., Halstead, D. K., Li, Z., May, J. F., Wedel, M., Austin, D. A. & Webster, N. J. G. (2005). Methyl Scanning: Total synthesis of demethylasterriquinone B1 and derivatives for identification of sites of interaction with and isolation of its receptor(s). *J. Amer. Chem. Soc.* **127**, 4609-4624.

Pockrandt, D. & Li, S.-M. (2013). Geranylation of cyclic dipeptides by the dimethylallyl transferase AnaPT resulting in a shift of prenylation position on the indole ring. *Chembiochem.* **14**, 2023-2028.

Pockrandt, D., Ludwig, L., Fan, A., Konig, G. M. & Li, S.-M. (2012). New insights into the biosynthesis of prenylated xanthones: XptB from *Aspergillus nidulans* catalyses an O-prenylation of xanthones. *Chembiochem* **13**, 2764-2771.

Pockrandt, D., Sack, C., Kosiol, T. & Li, S.-M. (2014). A promiscuous prenyltransferase from *Aspergillus oryzae* catalyses C-prenylations of hydroxynaphthalenes in the presence of different prenyl donors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**, 4987-4994.

Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S.-M. & Heide, L. (2003). CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 2316-2321.

Punt, P. J., Dingemanse, M. A., Kuyvenhoven, A., Soede, R. D., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1990). Functional elements in the promoter region of the *Aspergillus nidulans gpdA* gene encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Gene* **93**, 101-109.

Rabindran, S. K., He, H., Singh, M., Brown, E., Collins, K. I., Annable, T. & Greenberger, L. M. (1998). Reversal of a novel multidrug resistance mechanism in human colon carcinoma cells by fumitremorgin C. *Cancer Res.* **58**, 5850-5858.

Rabindran, S. K., Ross, D. D., Doyle, L. A., Yang, W. & Greenberger, L. M. (2000). Fumitremorgin C reverses multidrug resistance in cells transfected with the breast cancer resistance protein. *Cancer Res.* **60**, 47-50.

Riederer, B., Han, M. & Keller, U. (1996). D-Lysergyl peptide synthetase from the ergot fungus *Claviceps purpurea*. *J. Biol. Chem.* **271**, 27524-27530.

Roper, M. G., Qian, W. J., Zhang, B. B., Kulkarni, R. N., Kahn, C. R. & Kennedy, R. T. (2002). Effect of the insulin mimetic L-783,281 on intracellular [Ca^{2+}] and insulin secretion from pancreatic b-cells. *Diabetes* **51**, S43-S49.

Röttig, M., Medema, M. H., Blin, K., Weber, T., Rausch, C. & Kohlbacher, O. (2011). NRPSpredictor2 - a web server for predicting NRPS adenylation domain specificity. *Nucleic Acids Res.* **39**, W362-W367.

Rudolf, J. D. & Poulter, C. D. (2013). Tyrosine *O*-prenyltransferase SirD catalyzes *S*-, *C*-, and *N*-prenylations on tyrosine and tryptophan derivatives. *ACS Chem. Biol.* **8**, 2707-2714.

Rudolf, J. D., Wang, H. & Poulter, C. D. (2013). Multisite prenylation of 4-substituted tryptophans by dimethylallyltryptophan synthase. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1895-1902.

Saleh, O., Gust, B., Boll, B., Fiedler, H.-P. & Heide, L. (2009a). Aromatic prenylation in phenazine biosynthesis: dihydrophenazine-1-carboxylate dimethylallyltransferase from *Streptomyces anulatus*. *J. Biol. Chem.* **284**, 14439-14447.

Saleh, O., Haagen, Y., Seeger, K. & Heide, L. (2009b). Prenyl transfer to aromatic substrates in the biosynthesis of aminocoumarins, meroterpenoids and phenazines: The ABBA prenyltransferase family. *Phytochemistry* **70**, 1728-1738.

Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sasaki, K., Mito, K., Ohara, K., Yamamoto, H. & Yazaki, K. (2008). Cloning and characterization of naringenin 8-prenyltransferase, a flavonoid-specific prenyltransferase of *Sophora flavescens*. *Plant Physiol.* **146**, 1075-1084.

Schneider, P. (2009). Untersuchung der Biosynthese von Terrechinon A, Atromentin und Ralfuranon. *Dissertation Universität Freiburg im Breisgau*.

Schneider, P., Bouhired, S. & Hoffmeister, D. (2008a). Characterization of the atromentin biosynthesis genes and enzymes in the homobasidiomycete Tapinella panuoides. *Fungal Genet. Biol.* **45**, 1487-1496.

Schneider, P., Weber, M. & Hoffmeister, D. (2008b). The *Aspergillus nidulans* enzyme TdiB catalyzes prenyltransfer to the precursor of bioactive asterriquinones. *Fungal. Genet. Biol.* **45**, 302-309.

Schneider, P., Weber, M., Rosenberger, K. & Hoffmeister, D. (2007). A one-pot chemoenzymatic synthesis for the universal precursor of antidiabetes and antiviral bis-indolylquinones. *Chem. Biol.* **14**, 635-644.

Schuller, J. M., Zocher, G., Liebhold, M., Xie, X., Stahl, M., Li, S.-M. & Stehle, T. (2012). Structure and catalytic mechanism of a cyclic dipeptide prenyltransferase with broad substrate promiscuity. *J. Mol. Biol.* **422**, 87-99.

Schultz, A. W., Oh, D. C., Carney, J. R., Williamson, R. T., Udwary, D. W., Jensen, P. R., Gould, S. J., Fenical, W. & Moore, B. S. (2008). Biosynthesis and structures of cyclomarins and cyclomarazines, prenylated cyclic peptides of marine actinobacterial origin. *J Am. Chem Soc.* **130**, 4507-4516.

Schwarzer, D., Finking, R. & Marahiel, M. A. (2003). Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 275-287.

Schwarzer, D. & Marahiel, M. A. (2001). Multimodular biocatalysts for natural product assembly. *Naturwissenschaften* **88**, 93-101.

Seeger, K., Flinspach, K., Haug-Schifferdecker, E., Kulik, A., Gust, B., Fiedler, H. P. & Heide, L. (2011). The biosynthetic genes for prenylated phenazines are located at two different chromosomal loci of *Streptomyces cinnamonensis* DSM 1042. *Microb. Biotechnol.* **4**, 252-262.

Sekita, S. (1983). Isocochliodinol and neocochliodinol, bis(3-indolyl)-benzoquinones from *Chaetomium* spp. *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2998-3001.

Shenoy, A. R. & Visweswariah, S. S. (2003). Site-directed mutagenesis using a single mutagenic oligonucleotide and DpnI digestion of template DNA. *Anal. Biochem.* **319**, 335-336.

Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J. et al. (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Mol. Syst. Biol.* **7**, 539.

Sinensky, M. (2000). Recent advances in the study of prenylated proteins. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* **1484**, 93-106.

Singh, S. B., Ondeyka, J. G., Tsipouras, N., Ruby, C. et al. (2004). Hinnuliquinone, a C2-symmetric dimeric non-peptide fungal metabolite inhibitor of HIV-1 protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 108-113.

Slack, G. J., Puniani, E., Frisvad, J. C., Samson, R. A. & Miller, J. D. (2009). Secondary metabolites from *Eurotium* species, *Aspergillus calidoustus* and *A. insuetus* common in Canadian homes with a review of their chemistry and biological activities. *Mycol. Res.* **113**, 480-490.

Sohn, J. H., Lee, Y. R., Lee, D. S., Kim, Y. C. & Oh, H. (2013). PTP1B inhibitory secondary metabolites from marine-derived fungal strains *Penicillium* spp. and *Eurotium* sp. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1206-1211.

Staab, A., Loeffler, J., Said, H., Diehlmann, D. et al. (2007). Effects of HIF-1 inhibition by chetomin on hypoxia-related transcription and radiosensitivity in HT 1080 human fibrosarcoma cells. *BMC Cancer* **7**, 213.

Stachelhaus, T. & Marahiel, M. A. (1995). Modular structure of genes encoding multifunctional peptide synthetases required for non-ribosomal peptide synthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **125**, 3-14.

Stachelhaus, T., Mootz, H. D. & Marahiel, M. A. (1999). The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem. Biol.* **6**, 493-505.

Stec, E., Pistorius, D., Müller, R. & Li, S.-M. (2011). AuaA, a membrane-bound farnesyltransferase from *Stigmatella aurantiaca*, catalyzes the prenylation of 2-methyl-4-hydroxyquinoline in the biosynthesis of aurachins. *Chembiochem* **12**, 1724-1730.

Stec, E., Steffan, N., Kremer, A., Zou, H., Zheng, X. & Li, S.-M. (2008). Two Lysine residues are responsible for the enzymatic activities of indole prenyltransferases from fungi. *Chembiochem* **9**, 2055-2058.

Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W.-B., Kremer, A. & Li, S.-M. (2009a). Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Curr. Med. Chem.* **16**, 218-231.

Steffan, N., Grundmann, A., Afiyatullov, A., Ruan, H. & Li, S.-M. (2009b). FtmOx1, a non heme Fe(II) and alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase, catalyses the endoperoxide formation of verruculogen in *Aspergillus fumigatus*. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 4082-4087.

Steffan, N., Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2007). Chemoenzymatic synthesis of prenylated indole derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **8**, 1298-1307.

Steinbach, W. J., Benjamin, D. K., Kontoyiannis, D. P., Perfect, J. R. et al. (2004). Infections Due to *Aspergillus terreus*: A Multicenter Retrospective Analysis of 83 Cases. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 192-198.

Straus, D. C. (2011). The possible role of fungal contamination in sick building syndrome. *Front. Biosci. (Elite Ed).* **3**, 562-580.

Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F. & Wakefield, A. E. (2002). A new name (*Pneumocystis jiroveci*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 891-896.

Strohmeier, G. A., Pichler, H., May, O. & Gruber-Khadjawi, M. (2011). Application of designed enzymes in organic synthesis. *Chem. Rev.* **111**, 4141-4164.

Takahashi, I., Ojima, N., Ogura, K. & Seto, S. (1978). Purification and characterization of dimethylallyl pyrophosphate: aspulvinone dimethylallyltransferase from *Aspergillus terreus*. *Biochemistry* **17**, 2696-2702.

Takahashi, S., Takagi, H., Toyoda, A., Uramoto, M., Nogawa, T., Ueki, M., Sakaki, Y. & Osada, H. (2010). Biochemical characterization of a novel indole prenyltransferase from *Streptomyces* sp. SN-593. *J. Bacteriol.* **192**, 2839-2851.

Takase, S., Kawai, Y., Uchida, I., Tanaka, H. & Aoki, H. (1984). Structure of amauromine, a new alkaloid with vasodilating activity produced by *Amauroascus sp. Tetrahedron Lett.* **25**, 4673-4676.

Tanoue, Y., Motoi, T., Masuda, Y., Kai, N., Sakata, K., Hashimoto, M. & Nagai, T. (2008). A facile synthesis of asterriquinone D. *J. Heterocycl. Chem.* **45**, 1509-1511.

Tarcz, S., Ludwig, L. & Li, S.-M. (2014a). AstPT catalyses both reverse N1- and regular C2-prenylation of a methylated bisindolyl benzoquinone. *Chembiochem.* **15**, 108-116.

Tarcz, S., Xie, X. & Li, S.-M. (2014b). Substrate and catalytic promiscuity of secondary metabolite enzymes: *O*-prenylation of hydroxyxanthones with different prenyl donors by a bisindolyl benzoquinone *C*- and *N*-prenyltransferase. *RSC Adv.* **4**, 17986-17992.

Tello, M., Kuzuyama, T., Heide, L., Noel, J. P. & Richard, S. B. (2008). The ABBA family of aromatic prenyltransferases: broadening natural product diversity. *Cell Mol. Life Sci.* **65**, 1459-1463.

Terpe, K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**, 523-533.

Thom, C. & Church, M. B. (1918). *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *A. terreus* N. Sp. and Their Allies. *Am. J. Bot.* **5**, 84-104.

Tsai, H. F., Wang, H., Gebler, J. C., Poulter, C. D. & Schardl, C. L. (1995). The *Claviceps purpurea* gene encoding dimethylallyltryptophan synthase, the committed step for ergot alkaloid biosynthesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **216**, 119-125.

Tsunematsu, Y., Ishikawa, N., Wakana, D., Goda, Y., Noguchi, H., Moriya, H., Hotta, K. & Watanabe, K. (2013). Distinct mechanisms for spiro-carbon formation reveal biosynthetic pathway crosstalk. *Nat. Chem. Biol.* **9**, 818-825.

Tudzynski, P., Correia, T. & Keller, U. (2001). Biotechnology and genetics of ergot alkaloids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **57**, 593-605.

Umeda, M., Ohtsubo, K., Saito, M., Sekita, S. & Yoshihira, K. (1975). Cytotoxicity of new cytochalasans from *Chaetomium globosum*. *Experientia* **31**, 435-438.

Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2005). Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* **151**, 1499-1505.

Unsöld, I. A. & Li, S.-M. (2006). Reverse prenyltransferase in the biosynthesis of fumigaclavine C in *Aspergillus fumigatus*: gene expression, purification and characterization of fumigaclavine C synthase FgaPT1. *Chembiochem* **7**, 158-164.

Usui, T., Kondoh, M., Cui, C. B., Mayumi, T. & Osada, H. (1998). Tryprostatin A, a specific and novel inhibitor of microtubule assembly. *Biochem. J.* **333**, 543-548.

van den Berg, B., Ellis, R. J. & Dobson, C. M. (1999). Effects of macromolecular crowding on protein folding and aggregation. *EMBO J.* **18**, 6927-6933.

van Hartingsveldt, W., Mattern, I. E., van Zeijl, C. M. F., Pouwels, P. H. & van den Hondel, C. A. M. J. J. (1987). Development of a homologous transformation system for Aspergillus niger based on the pyrG gene. *Mol. Gen. Genet.* **206**, 71-75.

Wackler, B., Lackner, G., Chooi, Y. H. & Hoffmeister, D. (2012). Characterization of the *Suillus grevillei* quinone synthetase GreA supports a nonribosomal code for aromatic alpha-keto acids. *Chembiochem.* **13**, 1798-1804.

Wackler, B., Schneider, P., Jacobs, J. M., Pauly, J., Allen, C., Nett, M. & Hoffmeister, D. (2011). Ralfuranone biosynthesis in *Ralstonia solanacearum* suggests functional divergence in the quinone synthetase family of enzymes. *Chem. Biol.* **18**, 354-360.

Wallwey, C. & Li, S.-M. (2011). Ergot alkaloids: structure diversity, biosynthetic gene clusters and functional proof of biosynthetic genes. *Nat. Prod. Rep.* **28**, 496-510.

Wang, M. & Zhao, H. (2014). Characterization and Engineering of the Adenylation Domain of a NRPS-Like Protein: A Potential Biocatalyst for Aldehyde Generation. *ACS Catal.***4**, 1219-1225.

Webster, J. (1980) *Introduction to Fungi*. Cambridge University Press.

Wilkie, N., Wingrove, P. B., Bilsland, J. G., Young, L., Harper, S. J., Hefti, F., Ellis, S. & Pollack, S. J. (2001). The non-peptidyl fungal metabolite L-783,281 activates TRK neurotrophin receptors. *J. Neurochem.* **78**, 1135-1145.

Williams, R. M., Stocking, E. M. & Sanz-Cervera, J. F. (2000). Biosynthesis of prenylated alkaloids derived from tryptophan. *Topics Curr. Chem.* **209**, 97-173.

Wilson, D. M. (1976). Patulin and Penicillic Acid. In *Mycotoxins and Other Fungal Related Food Problems*, pp. 90-109. American Chemical Society.

Windle, C. L., Müller, M., Nelson, A. & Berry, A. (2014). Engineering aldolases as biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **19**, 25-33.

Winkelblech, J. & Li, S.-M. (2014). Biochemical investigations of two 6-DMATS enzymes from *Streptomyces* revealing novel features of L-tryptophan prenyltransferases. *Chembiochem.* **15**, 1030-1039.

Wollinsky, B., Ludwig, L., Hamacher, A., Yu, X., Kassack, M. U. & Li, S.-M. (2012a). Prenylation at the indole ring leads to a significant increase of cytotoxicity of tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **22**, 3866-3869.

Wollinsky, B., Ludwig, L., Xie, X. & Li, S.-M. (2012b). Breaking the regioselectivity of indole prenyltransferases: identification of regular *C3*-prenylated hexahydropyrrolo[2,3-*b*]indoles as side products of the regular *C2*-prenyltransferase FtmPT1. *Org. Biomol. Chem.* **10**, 9262-9270.

Woodside, A. B., Huang, Z. & Poulter, C. D. (1988). Trisammonium geranyl diphosphate. *Org. Synth.* **66**, 211-215.

Yamamoto, Y., Kiriyama, N., Shimizu, S. & Koshimura, S. (1976a). Antitumor activity of asterriquinone, a metabolic product from *Aspergillus terreus*. *Gann* **67**, 623-624.

Yamamoto, Y., Nishimura, K. & Kiriyama, N. (1976b). Studies on the metabolic products of *Aspergillus terreus*. I. Metabolites of the strain IFO 6123. *Chem. Pharm. Bull.* **24**, 1853-1859.

Yang, R.-Y., Kizer, D., Wu, H., Volckova, E. et al. (2008). Synthetic methods for the preparation of ARQ 501 (b-Lapachone) human blood metabolites. *Bioorgan. Med. Chem.* **16**, 5635-5643.

Yang, S. W., Mierzwa, R., Terracciano, J., Patel, M. et al. (2006). Chemokine receptor CCR-5 inhibitors produced by Chaetomium globosum. *J. Nat. Prod.* **69**, 1025-1028.

Yazaki, K., Kunihisa, M., Fujisaki, T. & Sato, F. (2002). Geranyl diphosphate:4-hydroxybenzoate geranyltransferase from *Lithospermum erythrorhizon*. Cloning and characterization of a key enzyme in shikonin biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**, 6240-6246.

Yazaki, K., Sasaki, K. & Tsurumaru, Y. (2009). Prenylation of aromatic compounds, a key diversification of plant secondary metabolites. *Phytochemistry* **70**, 1739-1745.

Yeh, H. H., Chiang, Y. M., Entwistle, R., Ahuja, M., Lee, K. H., Bruno, K. S., Wu, T. K., Oakley, B. R. & Wang, C. C. (2012). Molecular genetic analysis reveals that a nonribosomal peptide synthetase-like (NRPS-like) gene in *Aspergillus nidulans* is responsible for microperfuranone biosynthesis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 739-748.

Yin, S., Yu, X., Wang, Q., Liu, X. Q. & Li, S.-M. (2013a). Identification of a brevianamide F reverse prenyltransferase BrePT from *Aspergillus versicolor* with a broad substrate specificity towards tryptophan-containing cyclic dipeptides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1649-1660.

Yin, W.-B., Baccile, J. A., Bok, J. W., Chen, Y., Keller, N. P. & Schroeder, F. C. (2013b). A nonribosomal peptide synthetase-derived iron(III) complex from the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 2064-2067.

Yin, W.-B., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009a). Stereospecific synthesis of aszonalenins by using two recombinant prenyltransferases. *Org. Biomol. Chem.* **7**, 2202-2207.

Yin, W.-B., Grundmann, A., Cheng, J. & Li, S.-M. (2009b). Acetylaszonalenin biosynthesis in *Neosartorya fischeri*: Identification of the biosynthetic gene cluster by genomic mining and functional proof of the genes by biochemical investigation. *J. Biol. Chem.* **284**, 100-109.

Yin, W.-B., Ruan, H.-L., Westrich, L., Grundmann, A. & Li, S.-M. (2007). CdpNPT, an N-prenyltransferase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterisation. *Chembiochem* **8**, 1154-1161.

Yin, W.-B., Yu, X., Xie, X.-L. & Li, S.-M. (2010). Preparation of pyrrolo[2,3-b]indoles carrying a ß-configured reverse C3-dimethylallyl moiety by using a recombinant prenyltransferase CdpC3PT. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 2430-2438.

Yu, X. & Li, S.-M. (2011). Prenylation of flavonoids by using a dimethylallyltryptophan synthase 7-DMATS from *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem* **12**, 2280-2283.

Yu, X. & Li, S.-M. (2012). Prenyltransferases of the dimethylallyltryptophan synthase superfamily. *Methods Enzymol.* **516**, 259-278.

Yu, X., Liu, Y., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2012). Biochemical characterization of indole prenyltransferases: Filling the last gap of prenylation positions by a 5-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus clavatus*. *J. Biol. Chem.* **287**, 1371-1380.

Yu, X., Xie, X. & Li, S.-M. (2011). Substrate promiscuity of secondary metabolite enzymes: prenylation of hydroxynaphthalenes by fungal indole prenyltransferases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 737-748.

Yu, X., Zocher, G., Xie, X., Liebhold, M., Schütz, S., Stehle, T. & Li, S.-M. (2013). Catalytic mechanism of stereospecific formation of *cis*-configured prenylated pyrroloindoline diketopiperazines by indole prenyltransferases. *Chem. Biol.* **20**, 1492-1501.

Zhang, B., Salituro, G., Szalkowski, D., Li, Z. et al. (1999). Discovery of a small molecule insulin mimetic with antidiabetic activity in mice. *Science (Washington, D. C.)* **284**, 974-977.

Zhang, N., Castlebury, L. A., Miller, A. N., Huhndorf, S. M. et al. (2006). An overview of the systematics of the Sordariomycetes based on a four-gene phylogeny. *Mycologia* **98**, 1076-1087.

Zhang, Q., Li, H. Q., Zong, S. C., Gao, J. M. & Zhang, A. L. (2012). Chemical and bioactive diversities of the genus *Chaetomium* secondary metabolites. *Mini Rev. Med. Chem.* **12**, 127-148.

Zhao, S., Smith, K. S., Deveau, A. M., Dieckhaus, C. M., Johnson, M. A., Macdonald, T. L. & Cook, J. M. (2002). Biological activity of the tryprostatins and their diastereomers on human carcinoma cell lines. *J. Med. Chem.* **45**, 1559-1562.

Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J. L. (2004). An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* **32**, e115.

Zocher, G., Saleh, O., Heim, J. B., Herbst, D. A., Heide, L. & Stehle, T. (2012). Structure-based engineering increased the catalytic turnover rate of a novel phenazine prenyltransferase. *PLoS. One.* **7**, e48427.

Zou, H.-X., Xie, X., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2011). The tyrosine *O*-prenyltransferase SirD catalyzes *O*-, *N*-, and *C*-prenylations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **89**, 1443-1451.

Zou, H.-X., Xie, X.-L., Linne, U., Zheng, X.-D. & Li, S.-M. (2010). Simultaneous *C7*- and *N1*-prenylation of cyclo-L-Trp-L-Trp catalyzed by a prenyltransferase from *Aspergillus oryzae*. *Org. Biomol. Chem.* **8**, 3037-3044.

Zverina, E. A., Lamphear, C. L., Wright, E. N. & Fierke, C. A. (2012). Recent advances in protein prenyltransferases: substrate identification, regulation, and disease interventions. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **16**, 544-552.

6. Anhang

6.1. MS- und NMR-Spektren von Asterrichinon D und isolierten Produkten von AstPT

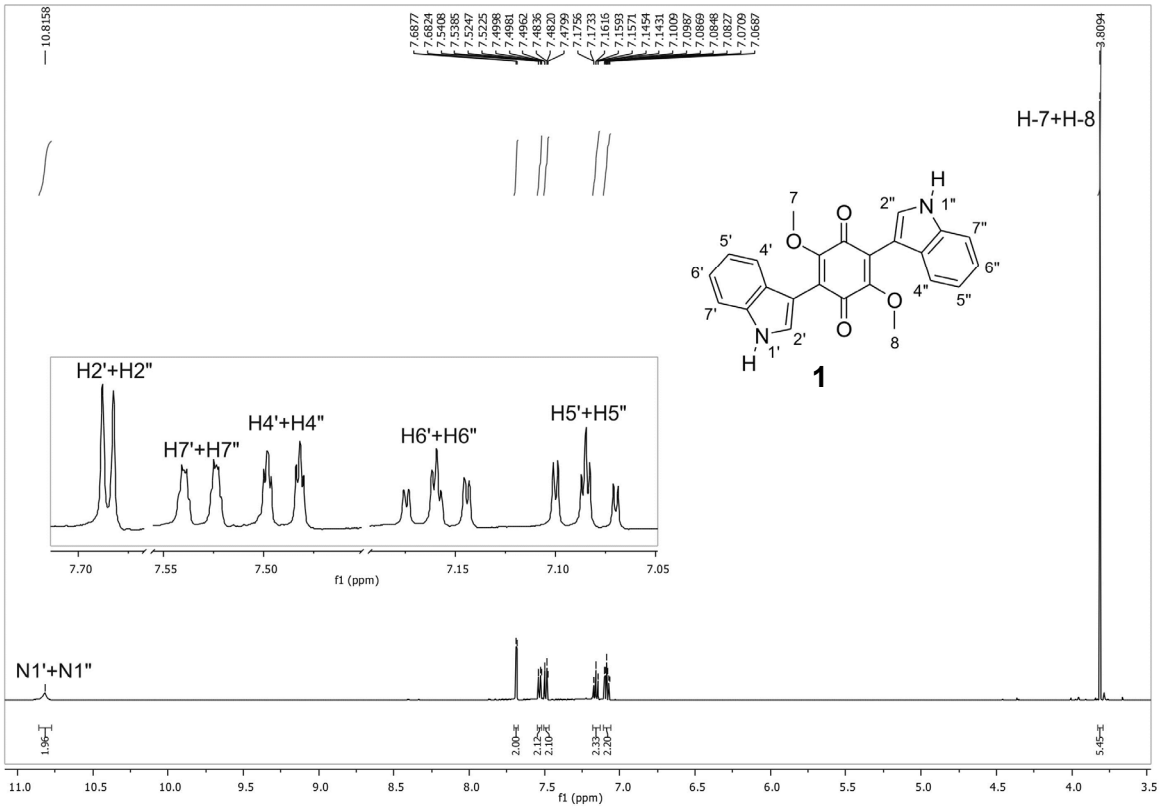


Abbildung 6-1: ^{1}H-NMR-Spektrum von AQ D gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

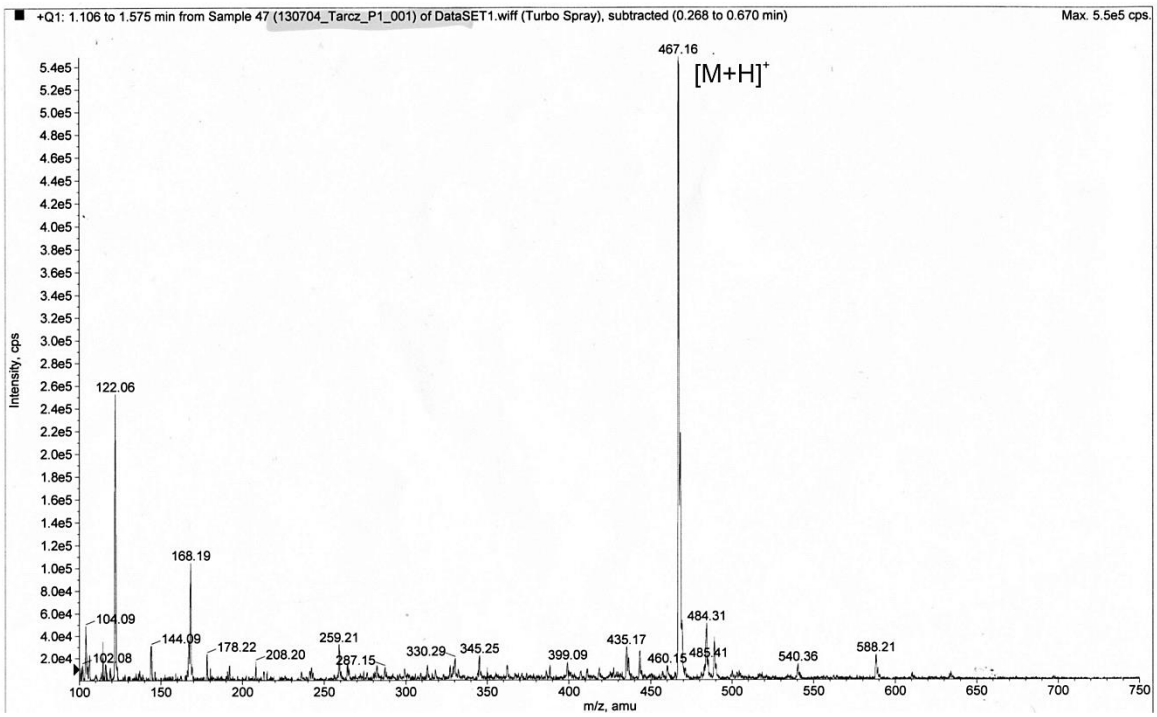


Abbildung 6-2: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes 2 ($C_{29}H_{26}N_2O_4$) von AstPT. Theoretische Masse $[M+H]^+$: 467,20.

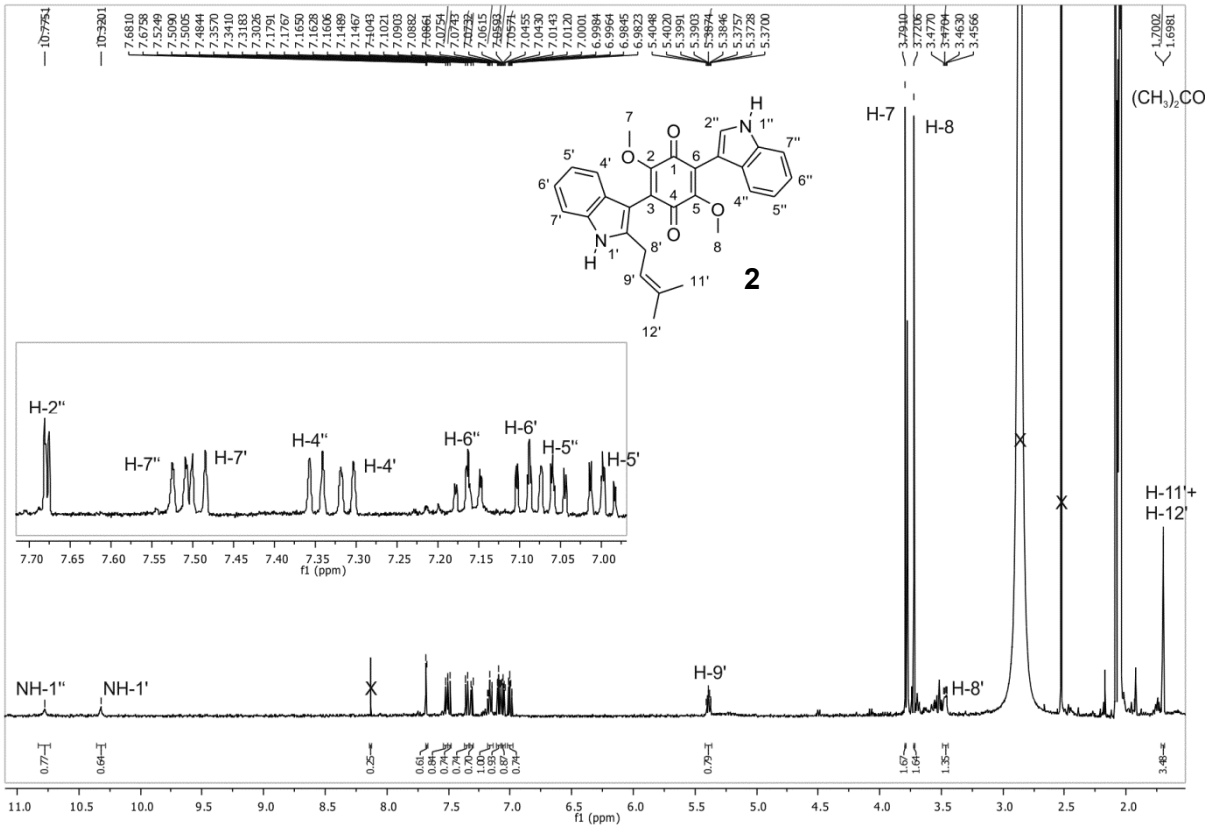


Abbildung 6-3: ^{1}H-NMR-Spektrum des Produktes 2 von AstPT gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

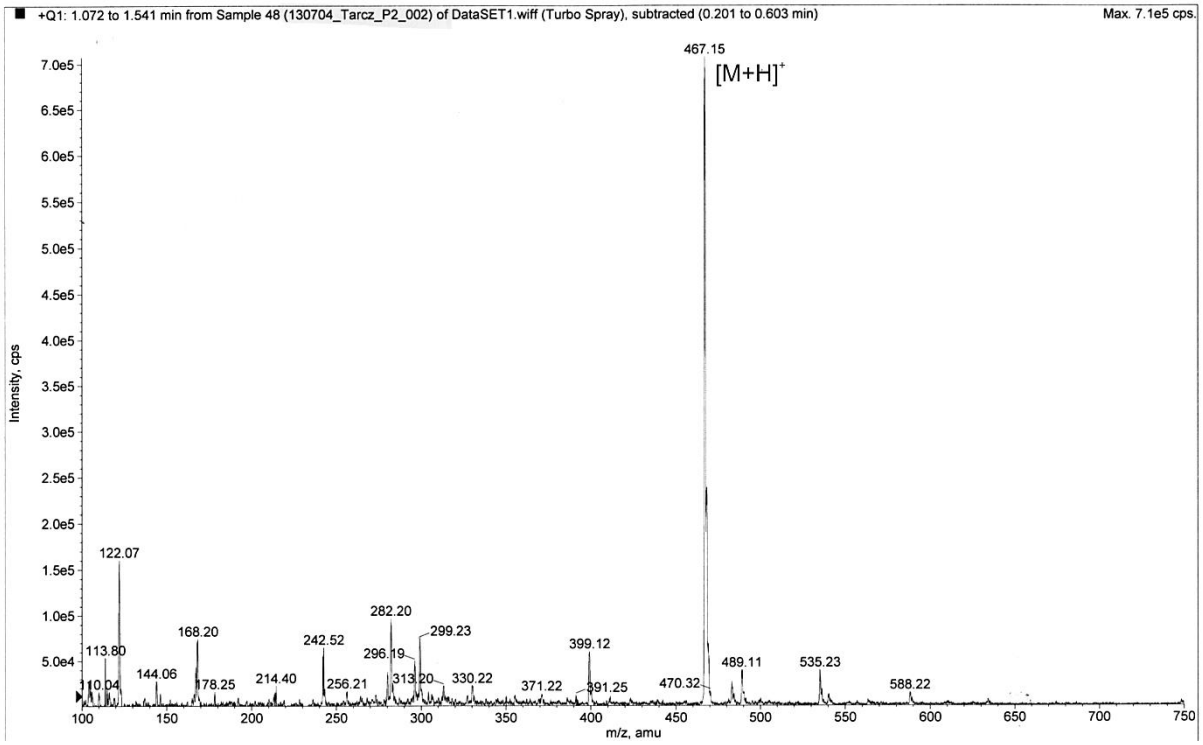


Abbildung 6-4: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes 3 ($C_{29}H_{26}N_2O_4$) von AstPT. Theoretische Masse $[M+H]^+$: 467,20.

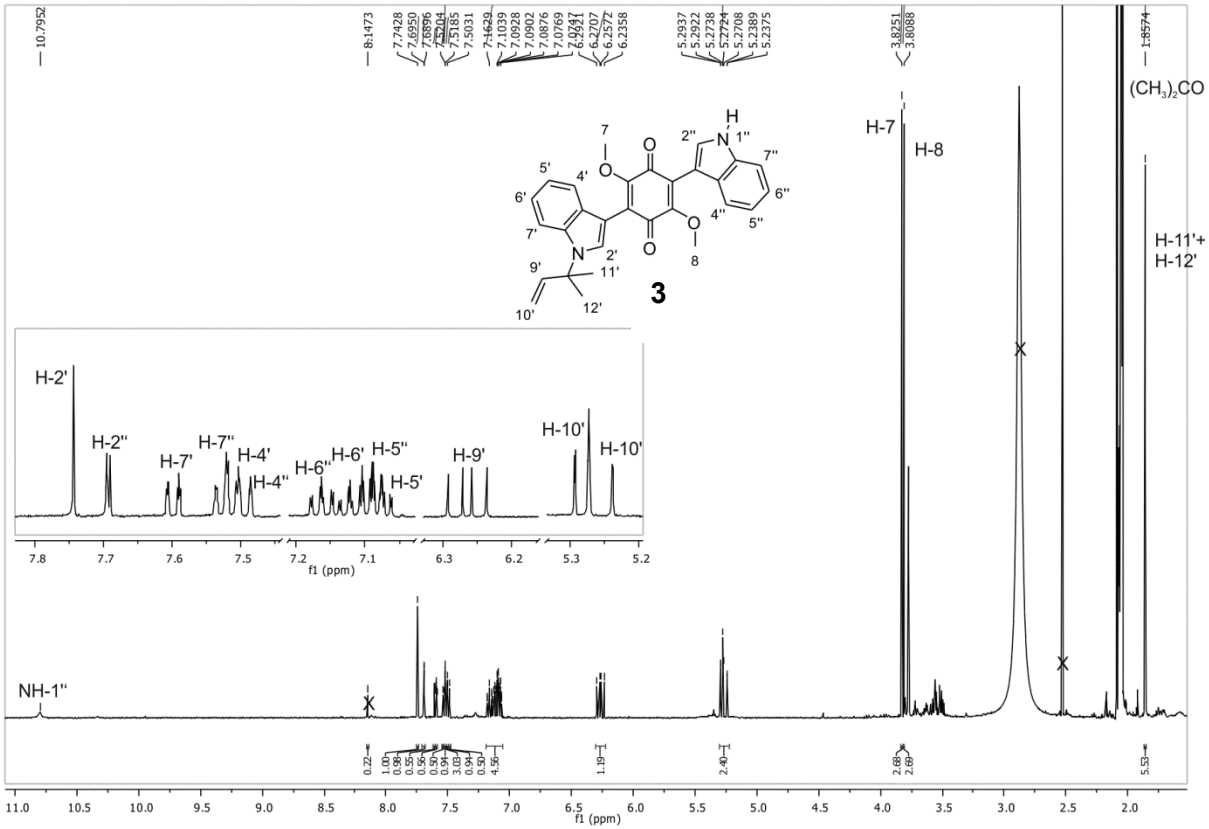


Abbildung 6-5: ^{1}H-NMR-Spektrum des Produktes 3 von AstPT gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

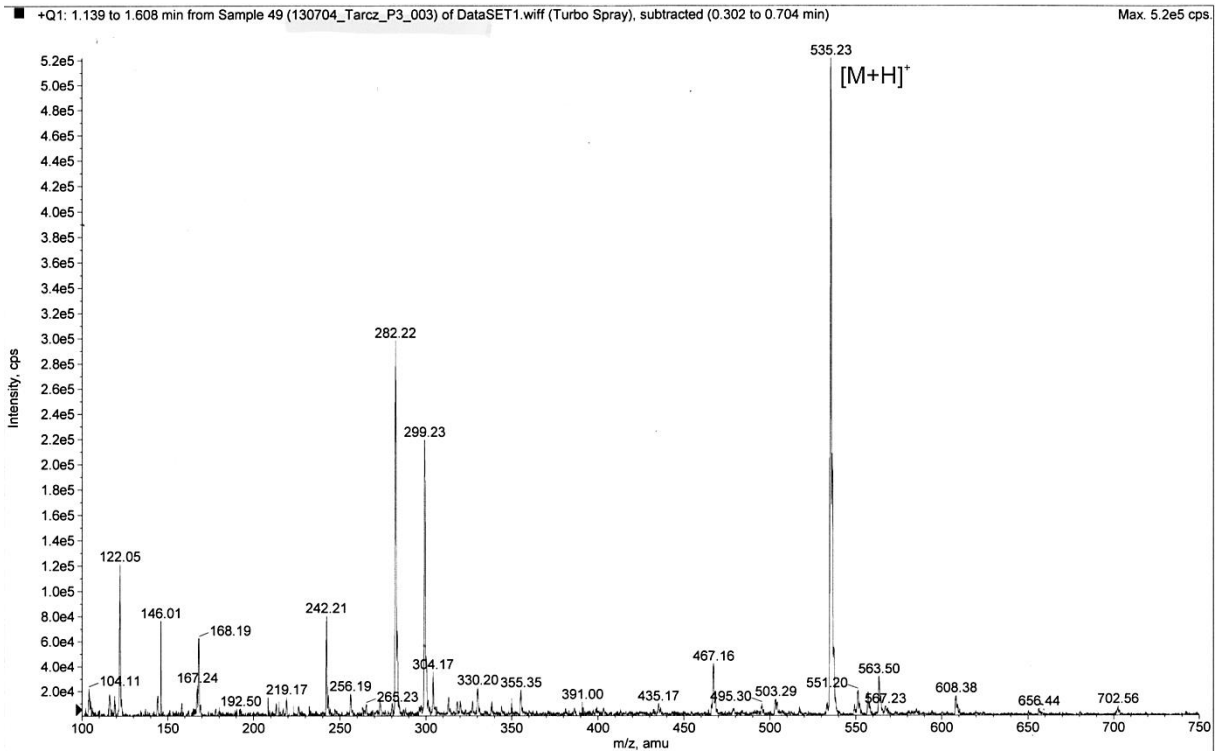


Abbildung 6-6: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes 4 ($C_{34}H_{34}N_2O_4$) von AstPT. Theoretische Masse $[M+H]^+$: 535,26.

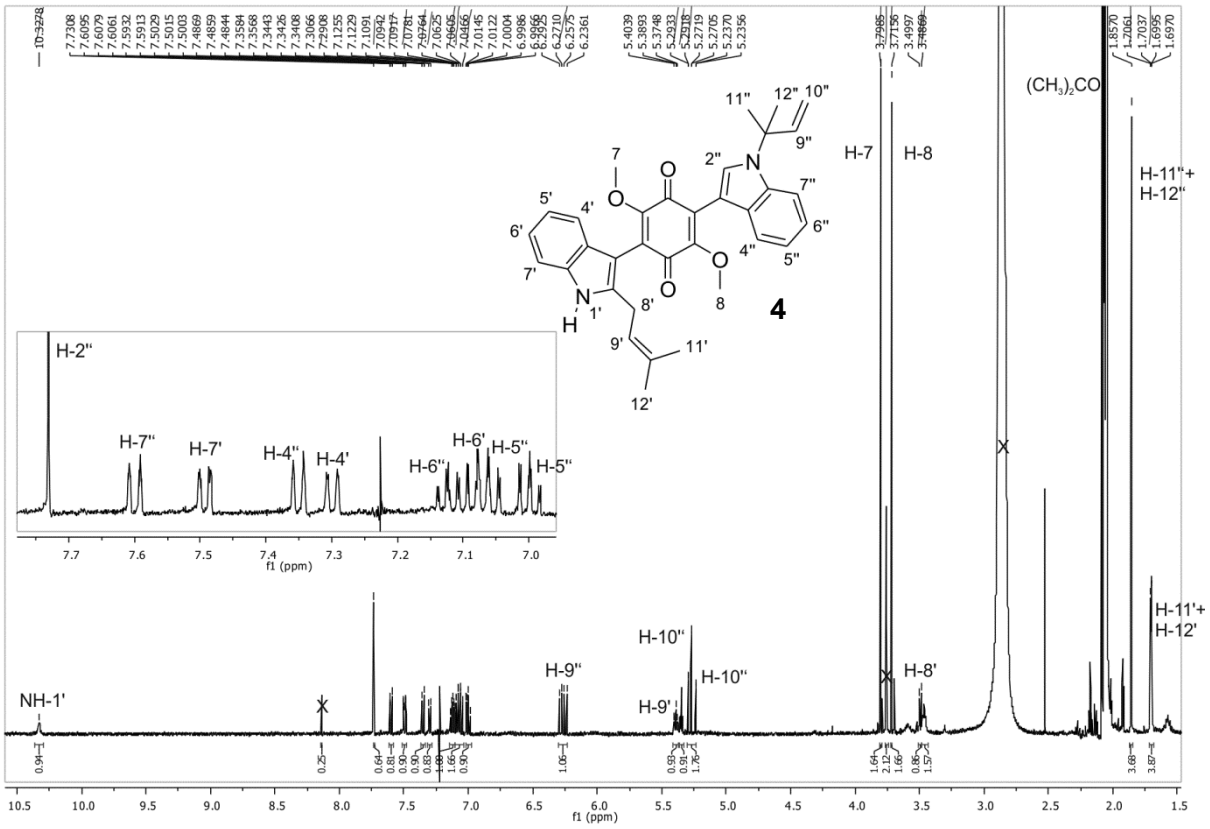


Abbildung 6-7: ^{1}H-NMR-Spektrum des Produktes 4 von AstPT gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

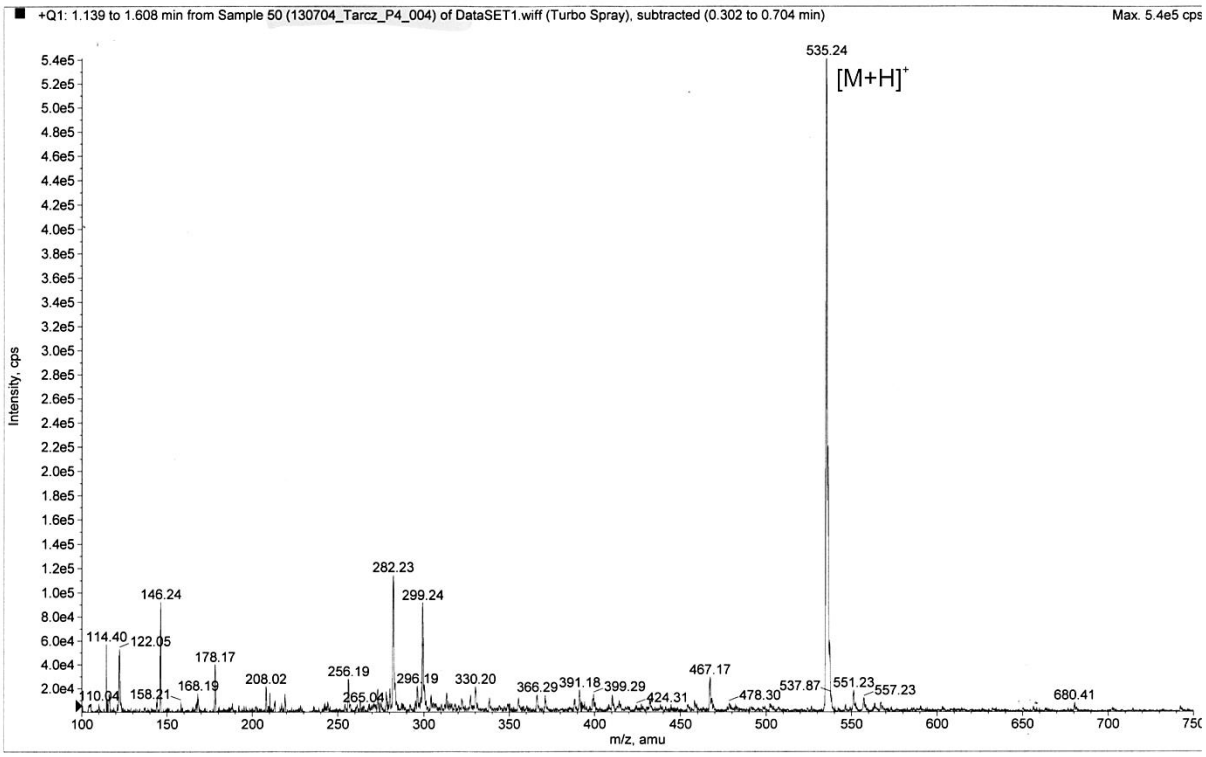


Abbildung 6-8: Positives ESI-MS-Spektrum des enzymatischen Produktes 5 ($C_{34}H_{34}N_2O_4$) von AstPT. Theoretische Masse $[M+H]^+$: 535,26.

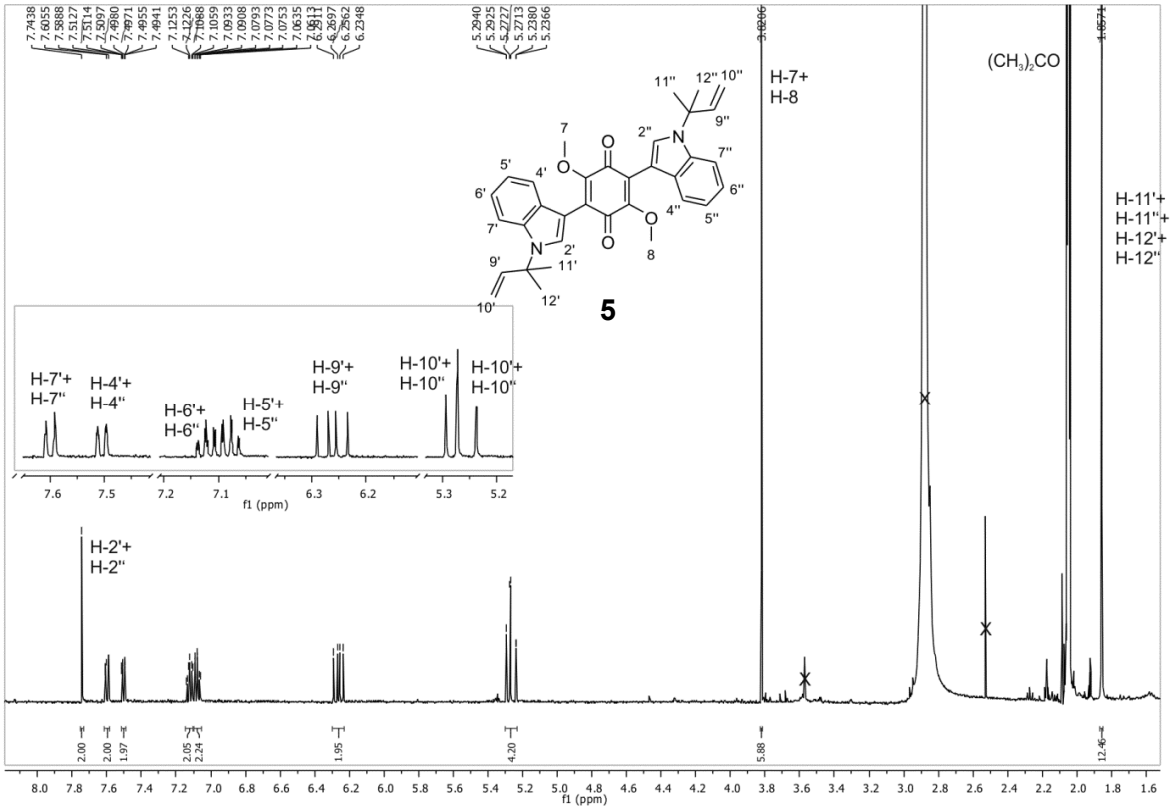


Abbildung 6-9: ^{1}H-NMR-Spektrum des Produktes 5 von AstPT gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

6.2. MS- und NMR-Spektren von Hydroxyxanthonen und isolierten Produkten von AstPT

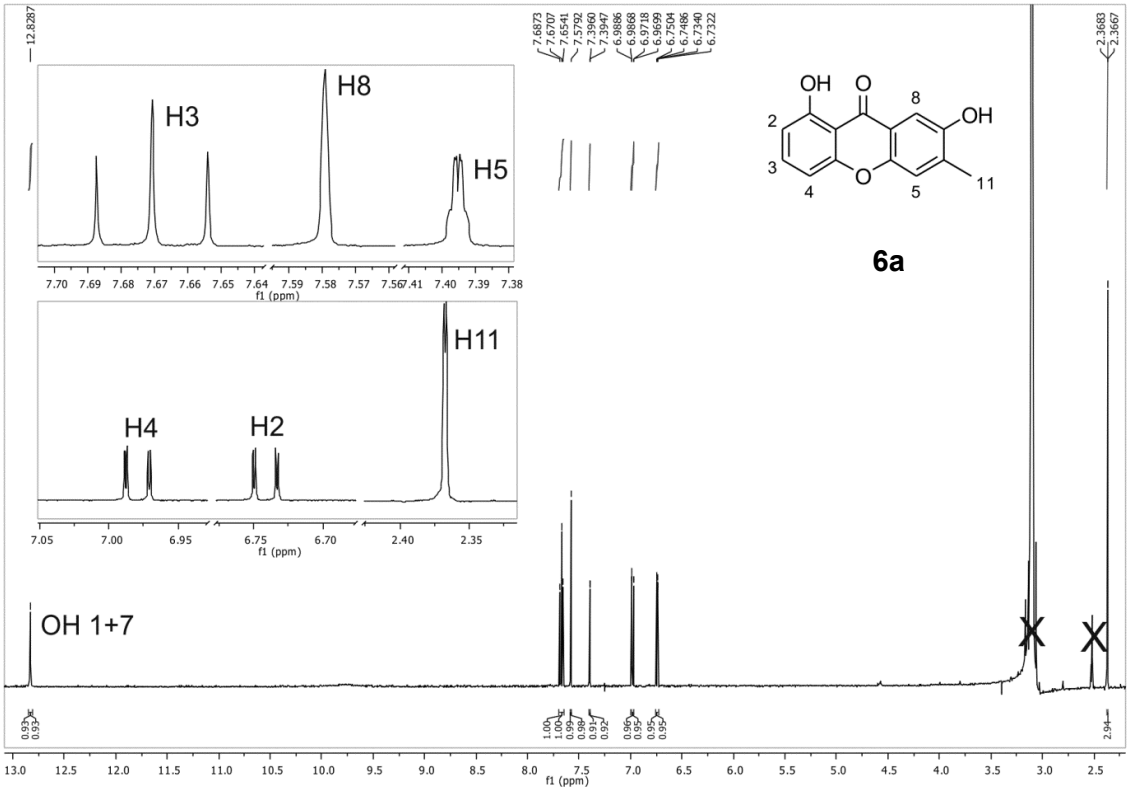


Abbildung 6-10: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6a gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

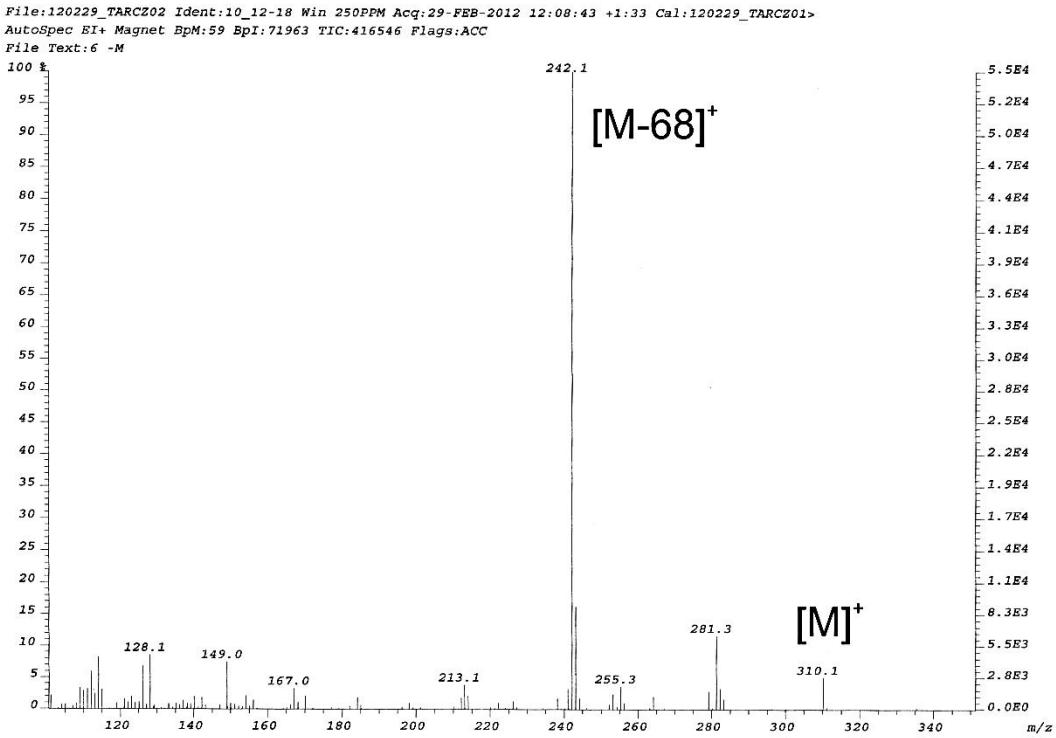


Abbildung 6-11: Positives EI-MS-Spektrum von 6b ($C_{19}H_{18}O_4$). Theoretische Masse $[M]^+$: 310,12.

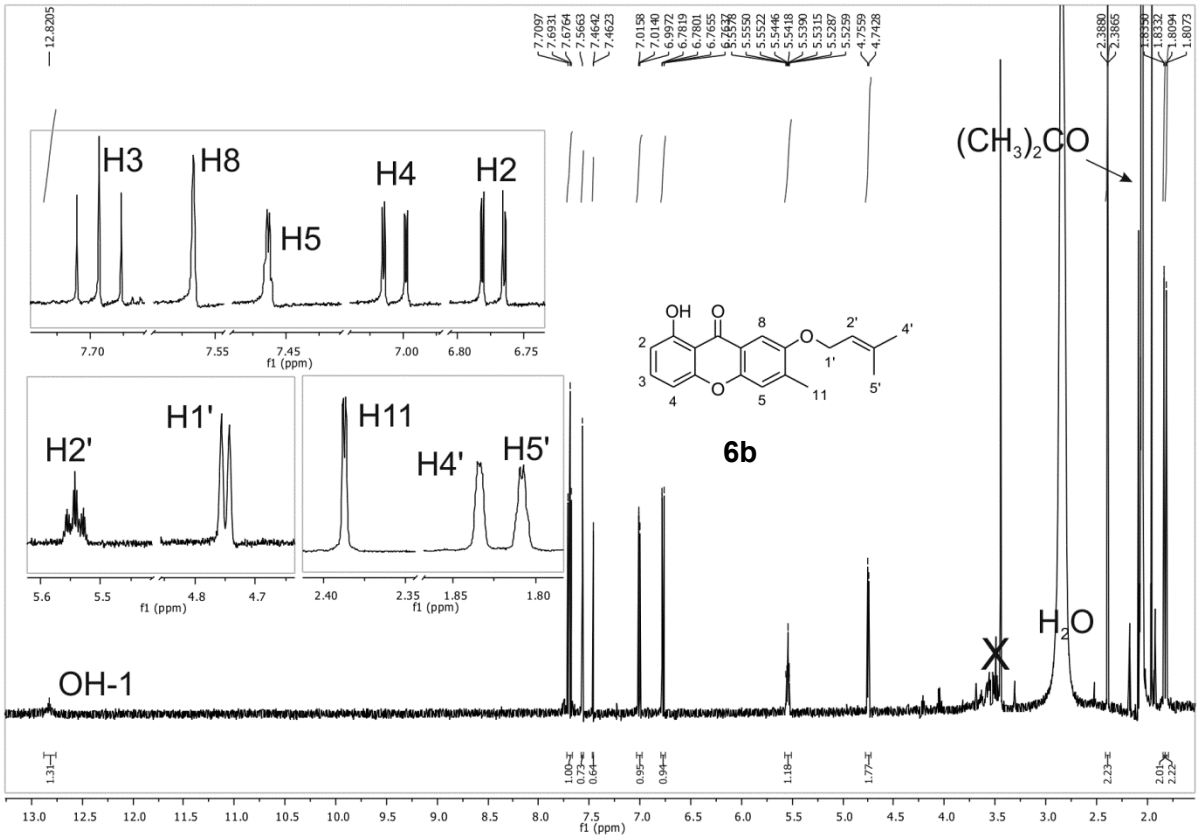


Abbildung 6-12: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6b gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

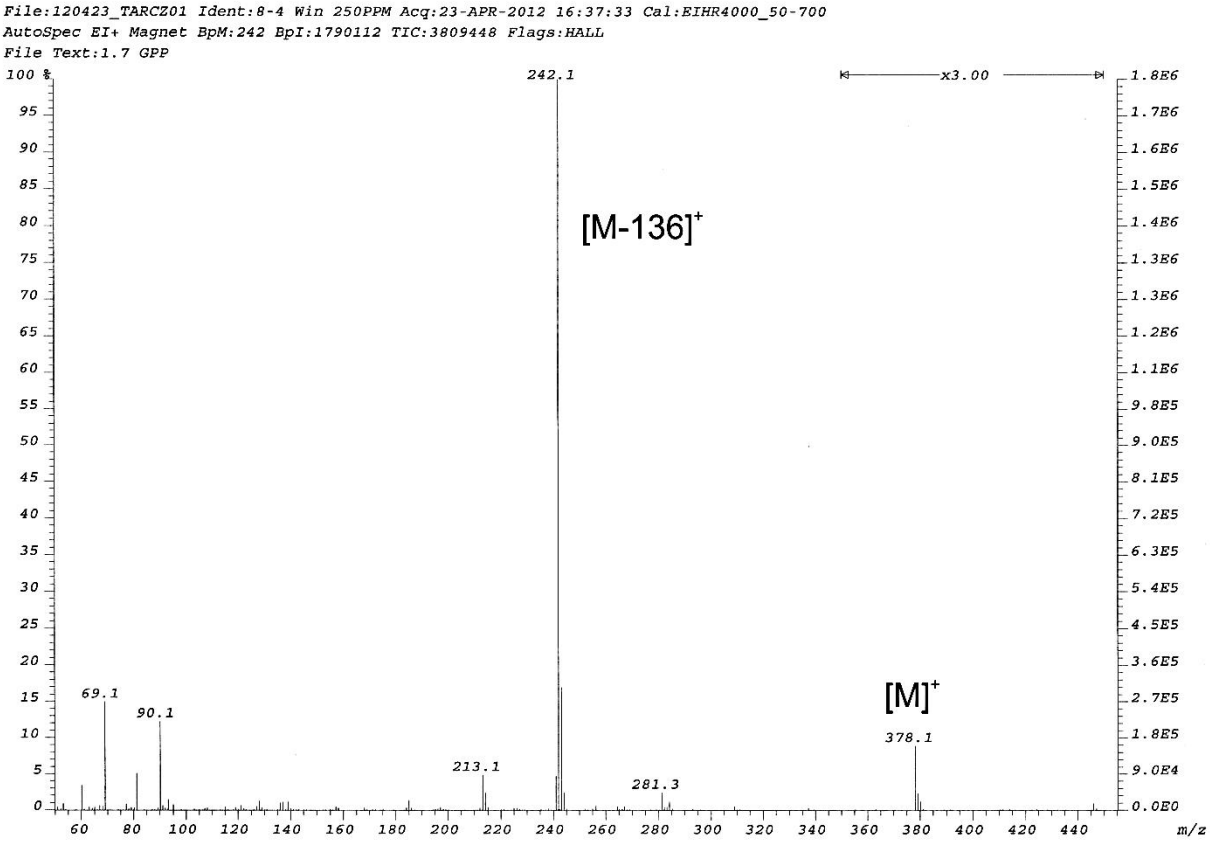


Abbildung 6-13: Positives EI-MS-Spektrum von 6c ($C_{24}H_{26}O_4$). Theoretische Masse $[M]^+$: 378,18.

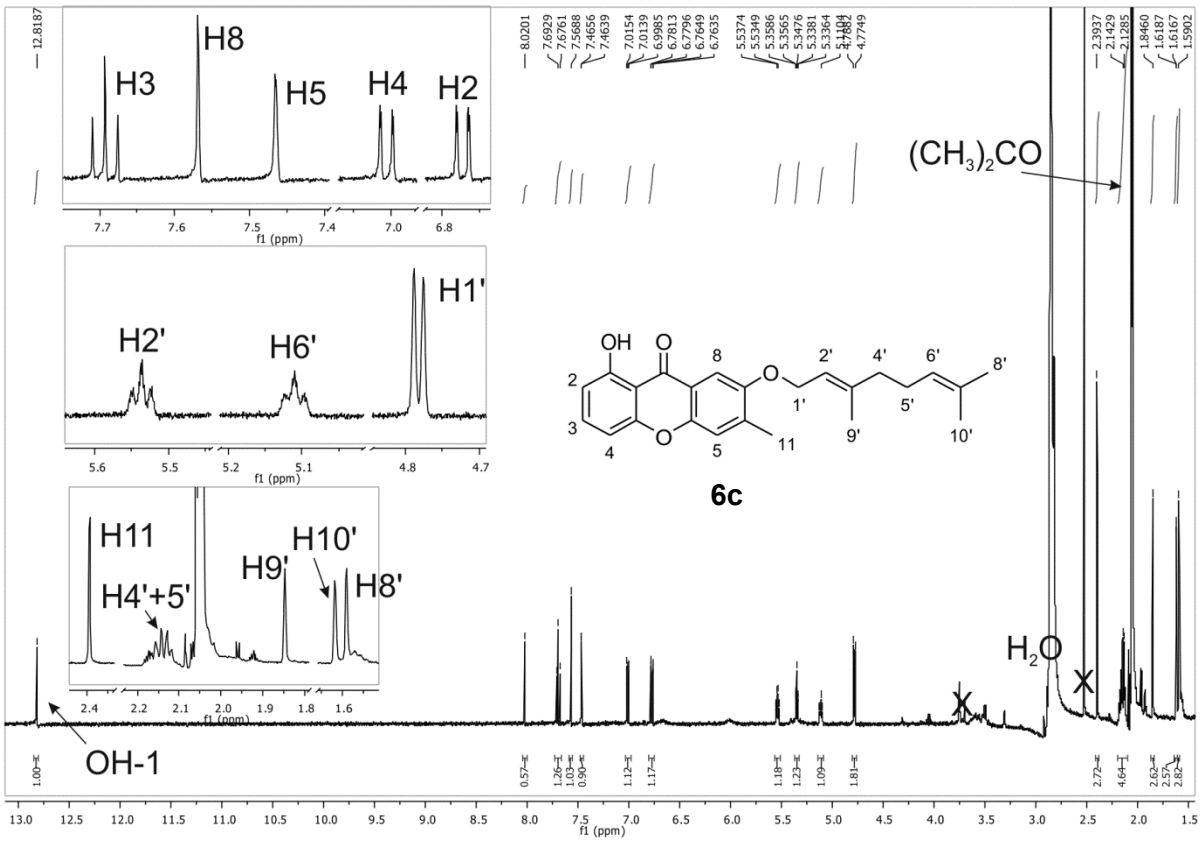


Abbildung 6-14: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6c gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

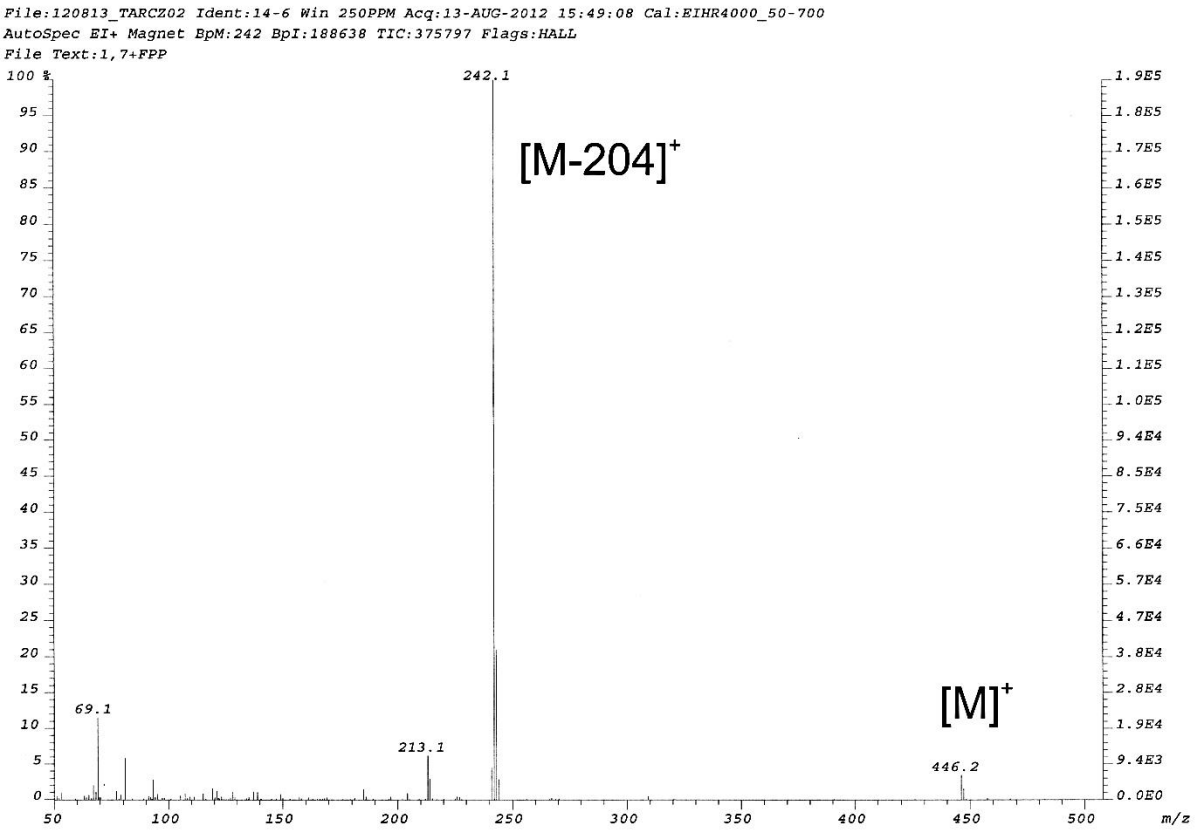


Abbildung 6-15: Positives EI-MS-Spektrum von 6d ($C_{29}H_{34}O_4$). Theoretische Masse $[M]^+$: 446,25.

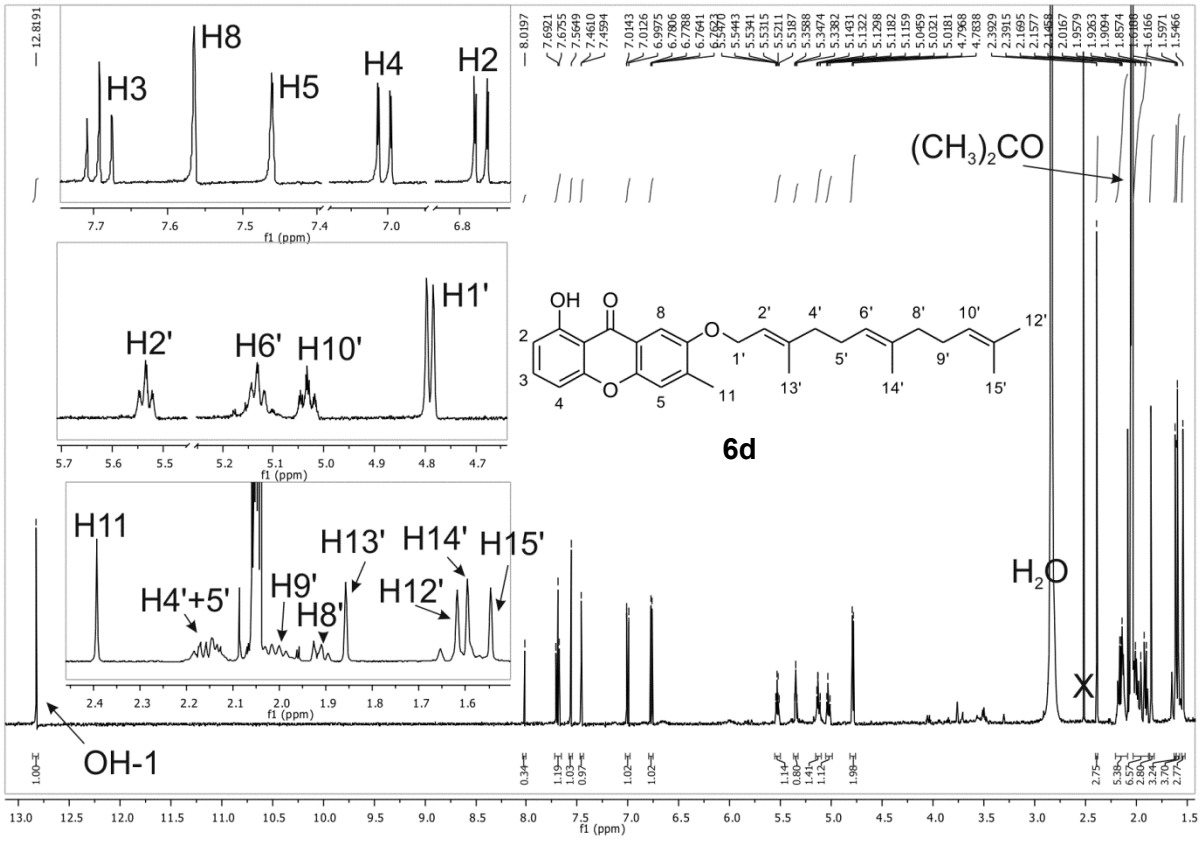


Abbildung 6-16: ^{1}H-NMR-Spektrum von 6d gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

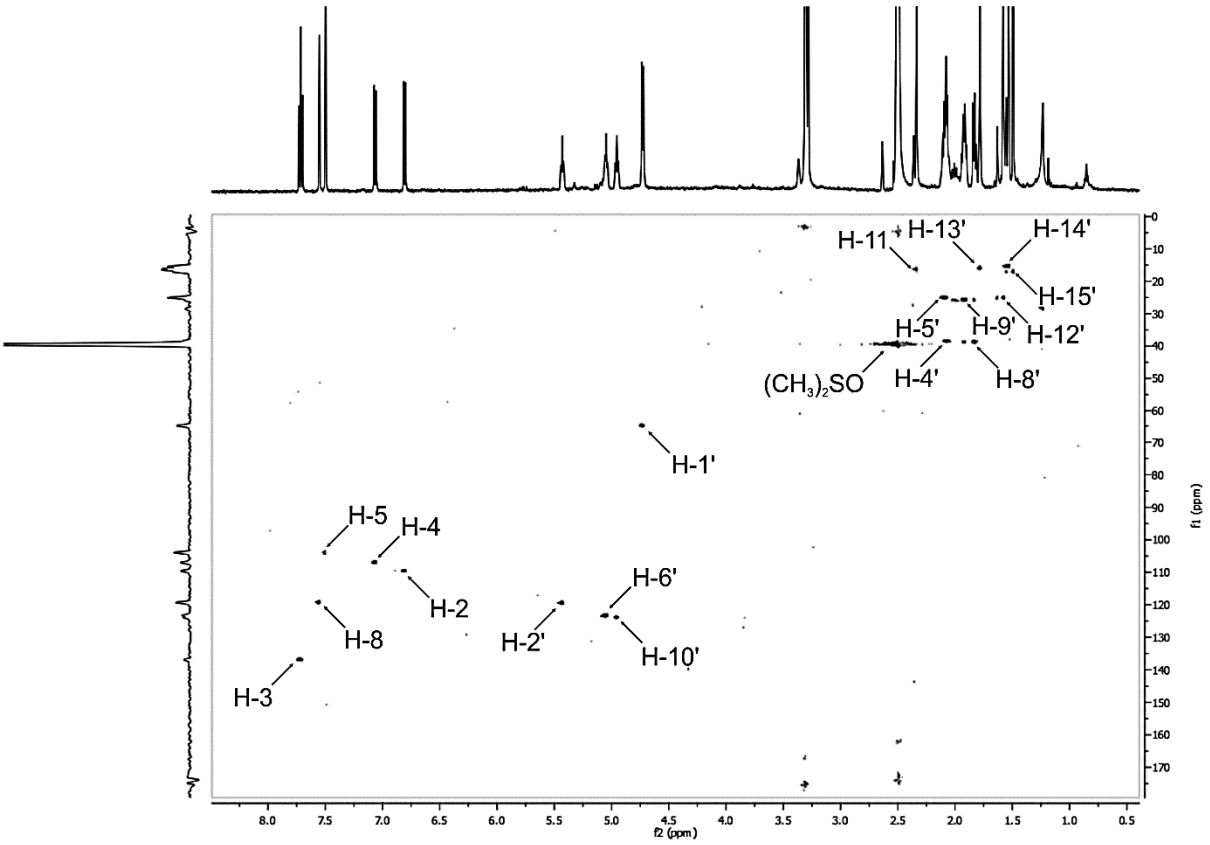


Abbildung 6-17: $^{1}H/^{13}C$-HSQC-Spektrum von 6d gemessen in $(CD_3)_2SO$ (500 MHz).

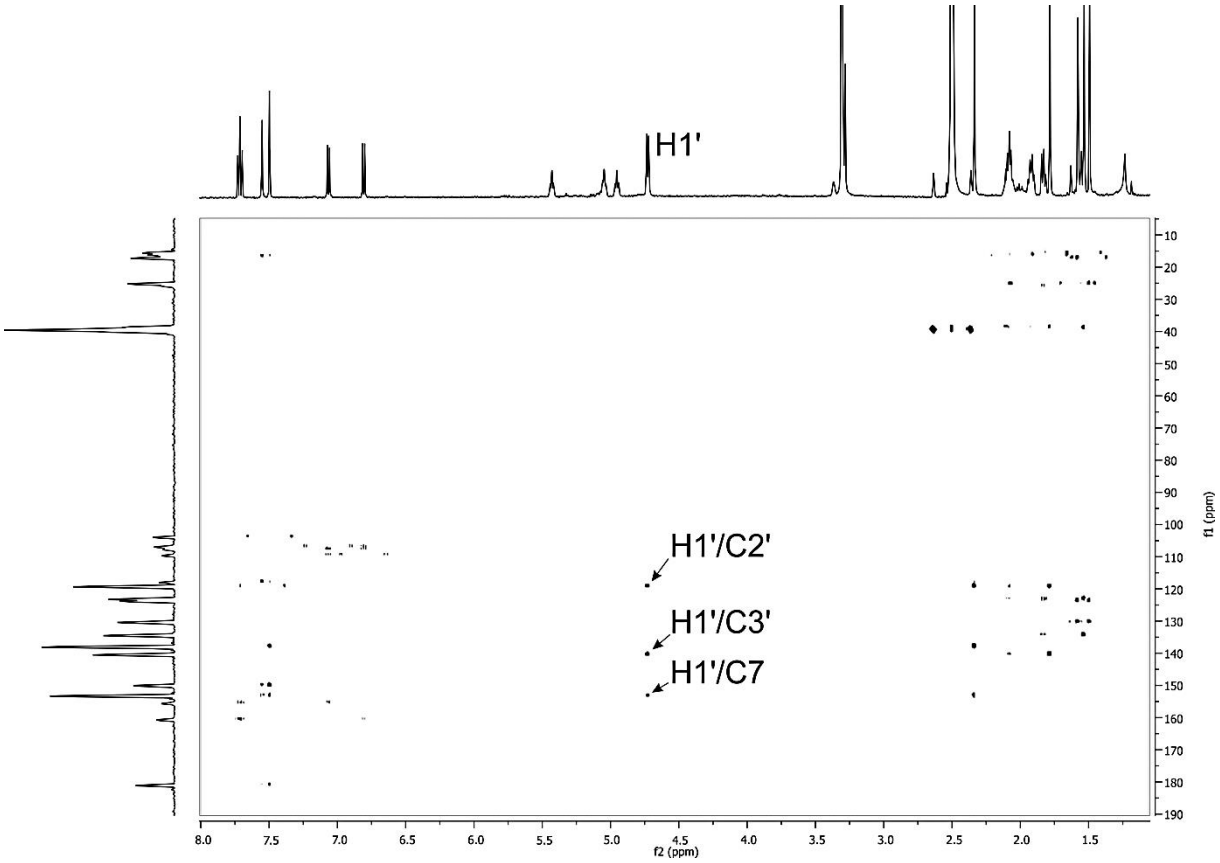


Abbildung 6-18: $^{1}H/^{13}C$-HMBC-Spektrum von 6d gemessen in $(CD_3)_2SO$ (500 MHz). Pfeile markieren die für die Strukturaufklärung relevanten Korrelationen zwischen Kernen des Xanthongrundgerüsts und des Prenylrests.

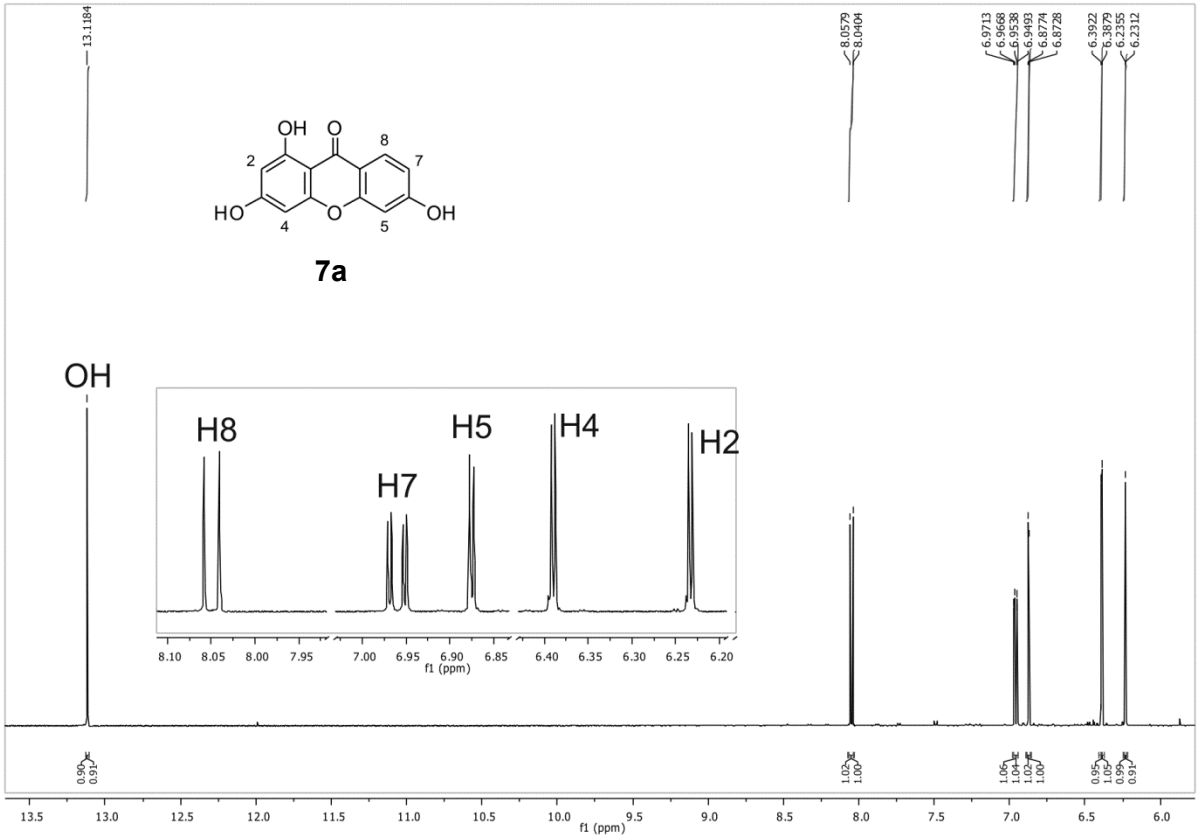


Abbildung 6-19: ^{1}H-NMR-Spektrum von 7a gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

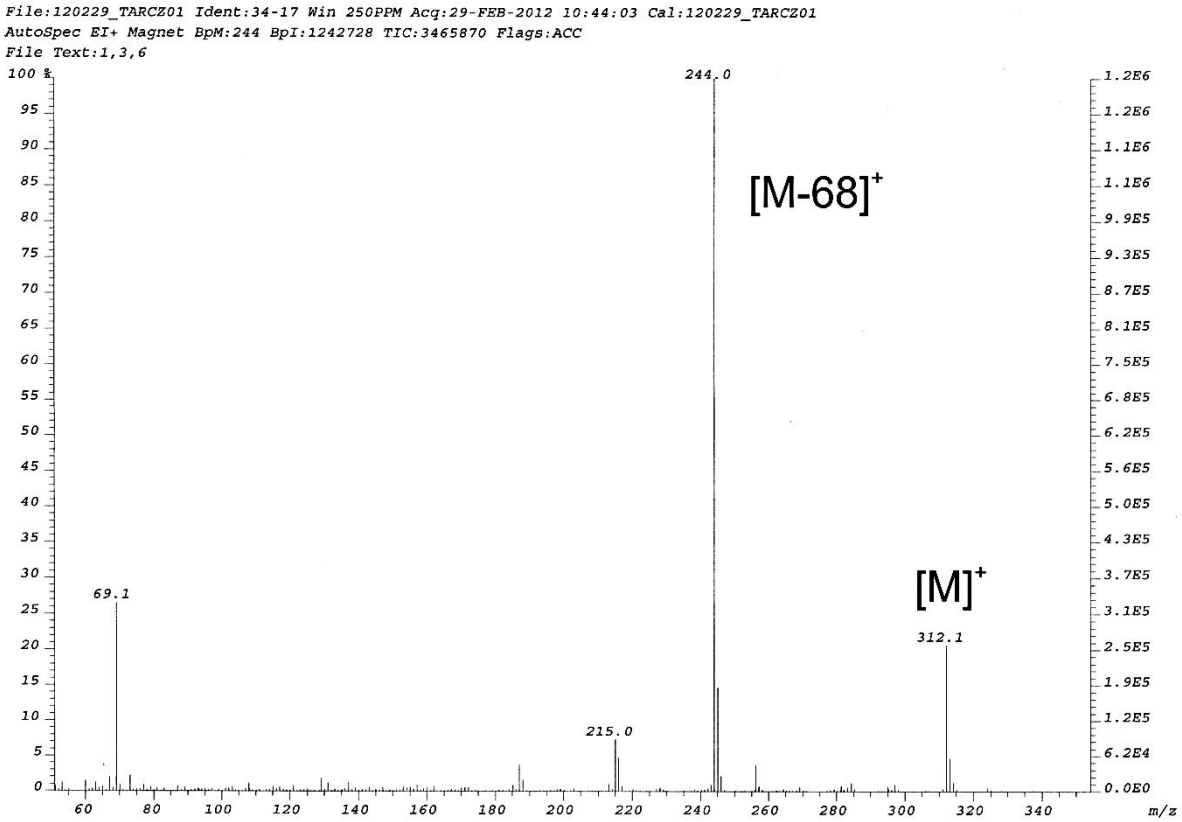


Abbildung 6-20: Positives EI-MS-Spektrum von 7b1 und 7b2 ($C_{18}H_{16}O_5$). Theoretische Masse $[M]^+$: 312,10.

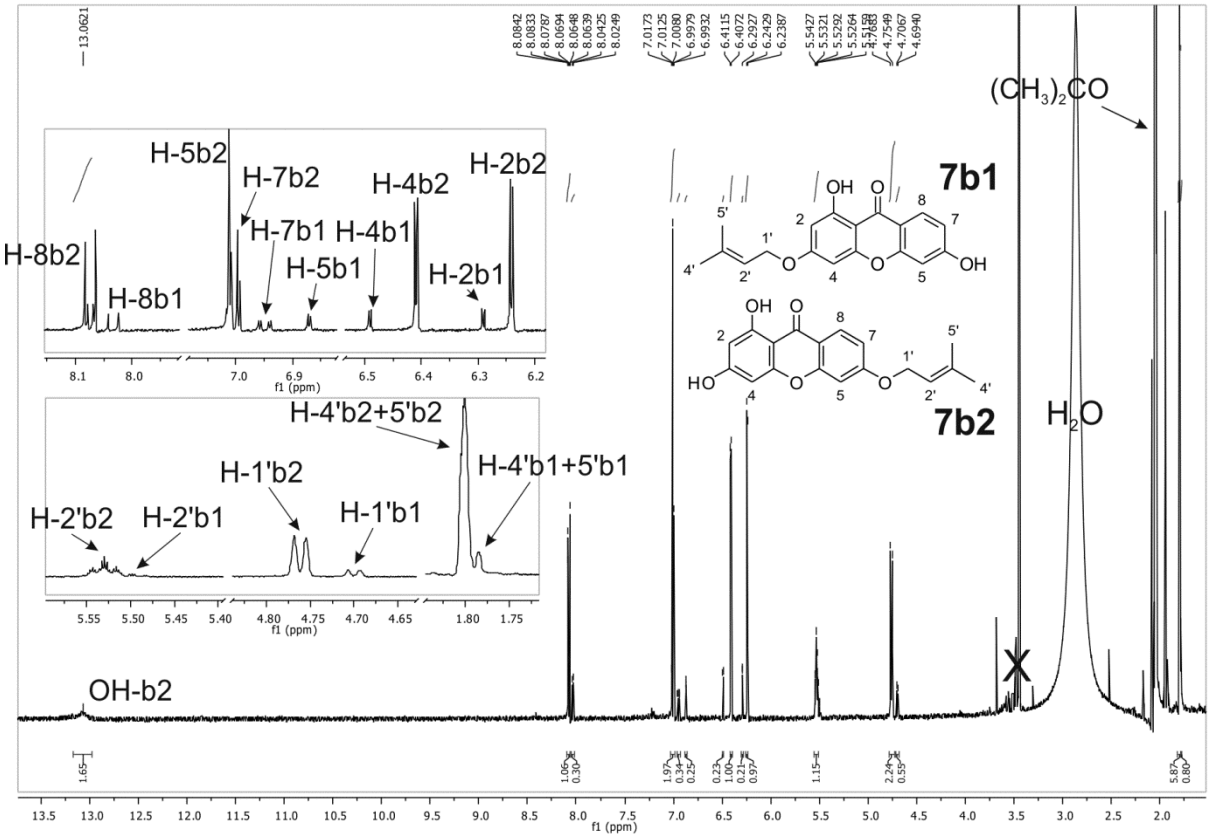


Abbildung 6-21: ^{1}H-NMR-Spektrum von 7b1 und 7b2 gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

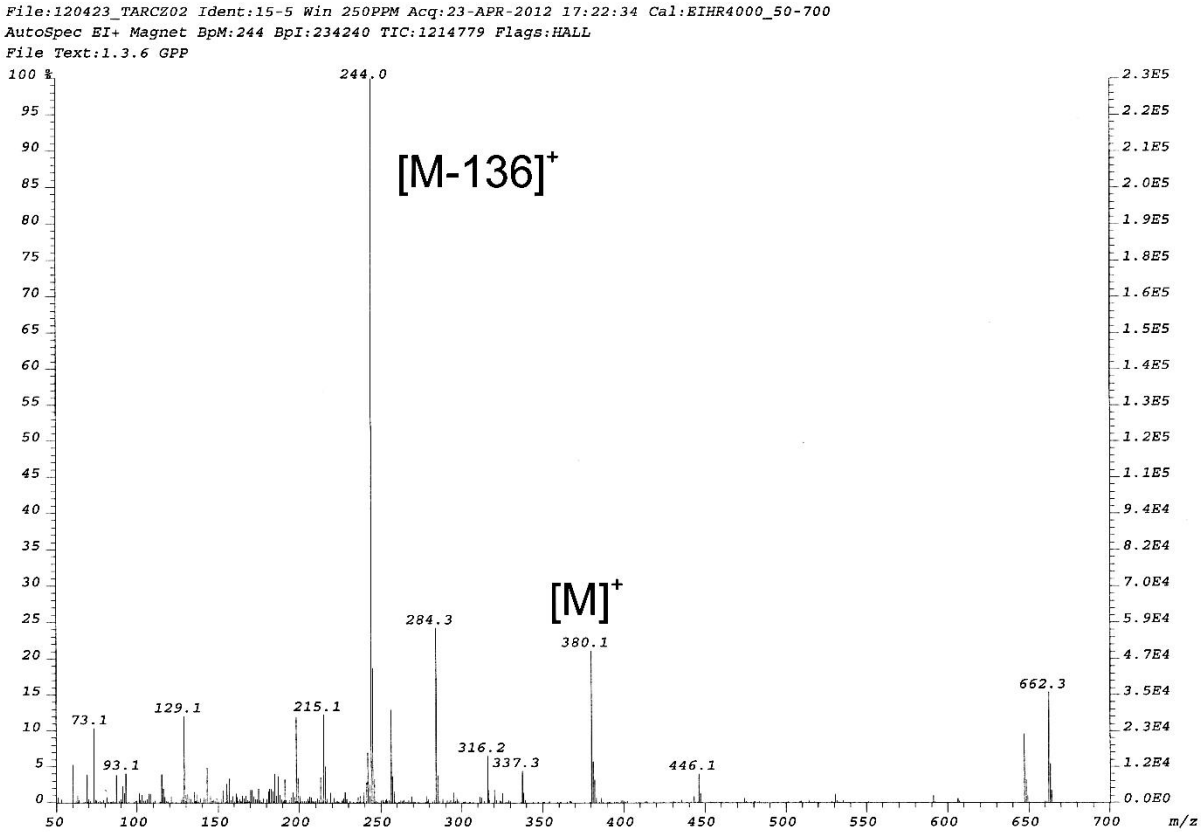


Abbildung 6-22: Positives EI-MS-Spektrum von 7c1 und 7c2 ($C_{23}H_{24}O_5$). Theoretische Masse $[M]^+$: 380,16.

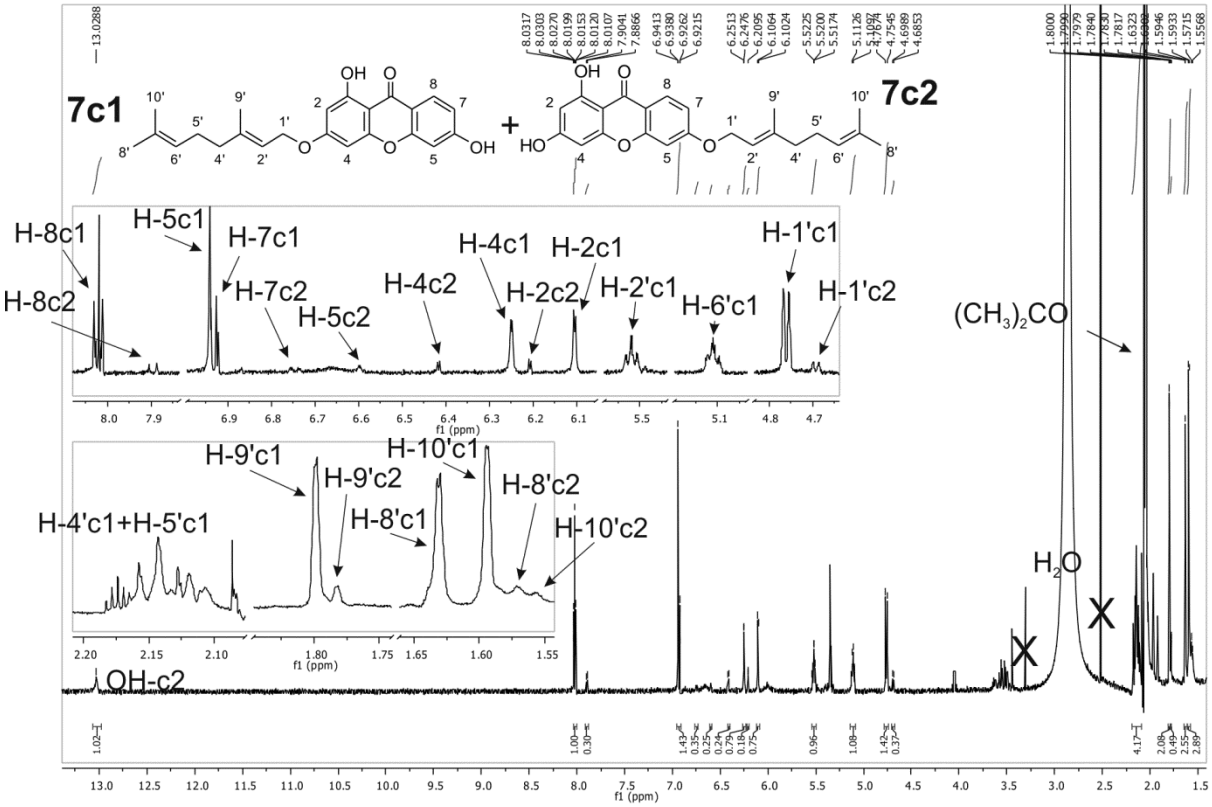


Abbildung 6-23: ^{1}H-NMR-Spektrum von 7c1 und 7c2 gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

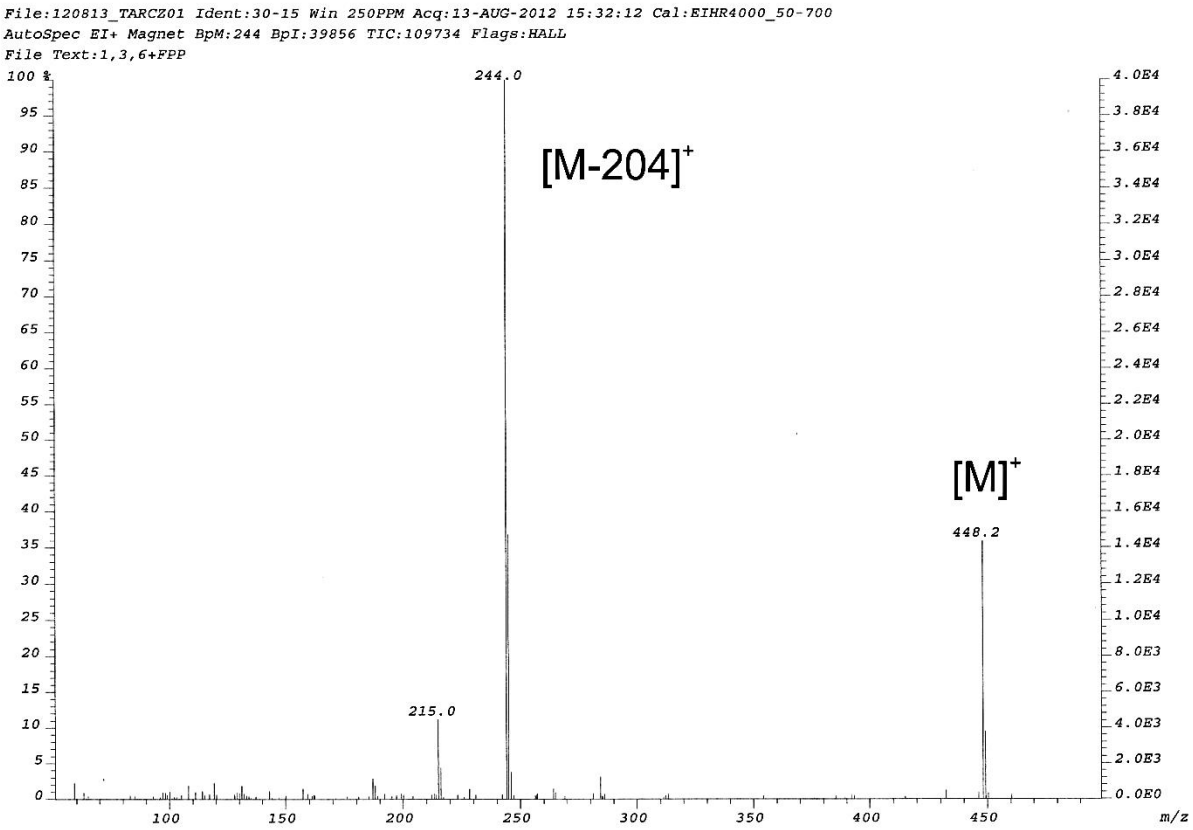


Abbildung 6-24: Positives ESI-MS-Spektrum von 7d1 und 7d2 ($C_{28}H_{32}O_5$). Theoretische Masse $[M+H]^+$: 448,22.

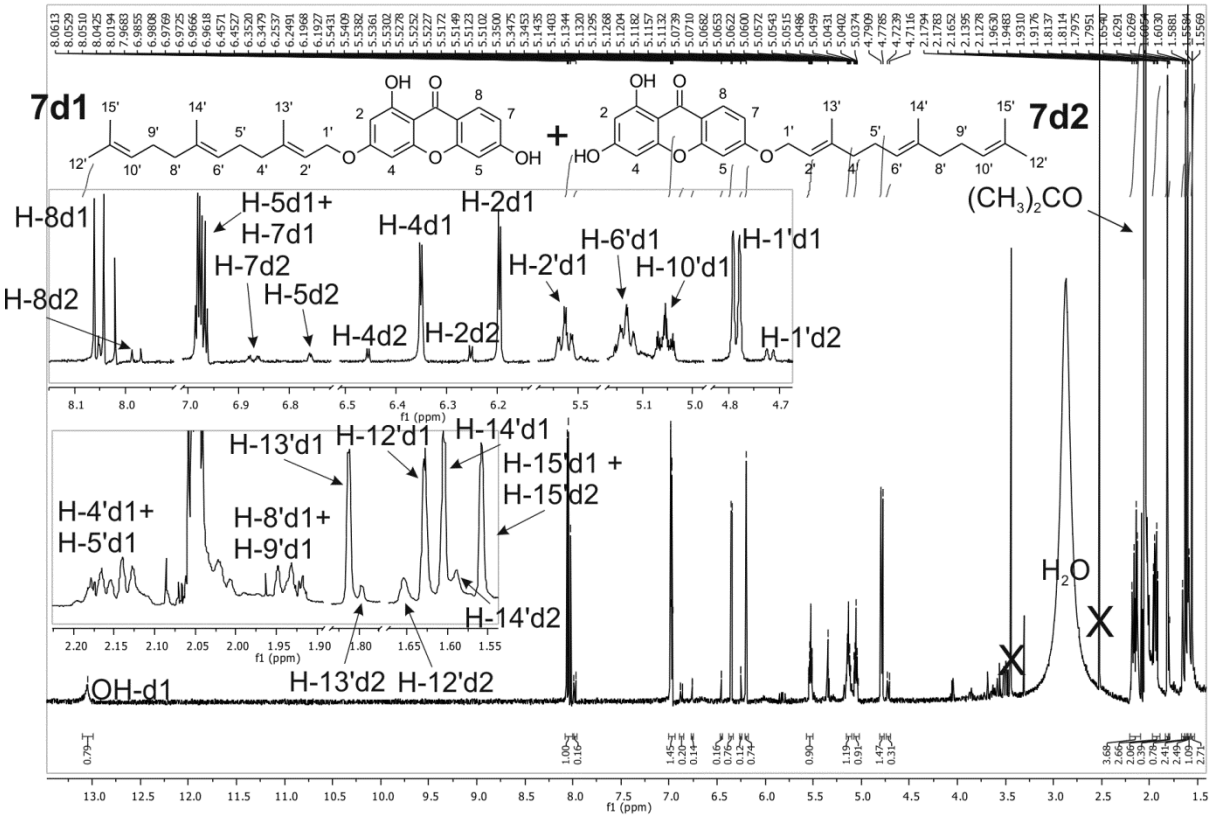


Abbildung 6-25: ^{1}H-NMR-Spektrum von 7d1 und 7d2 gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

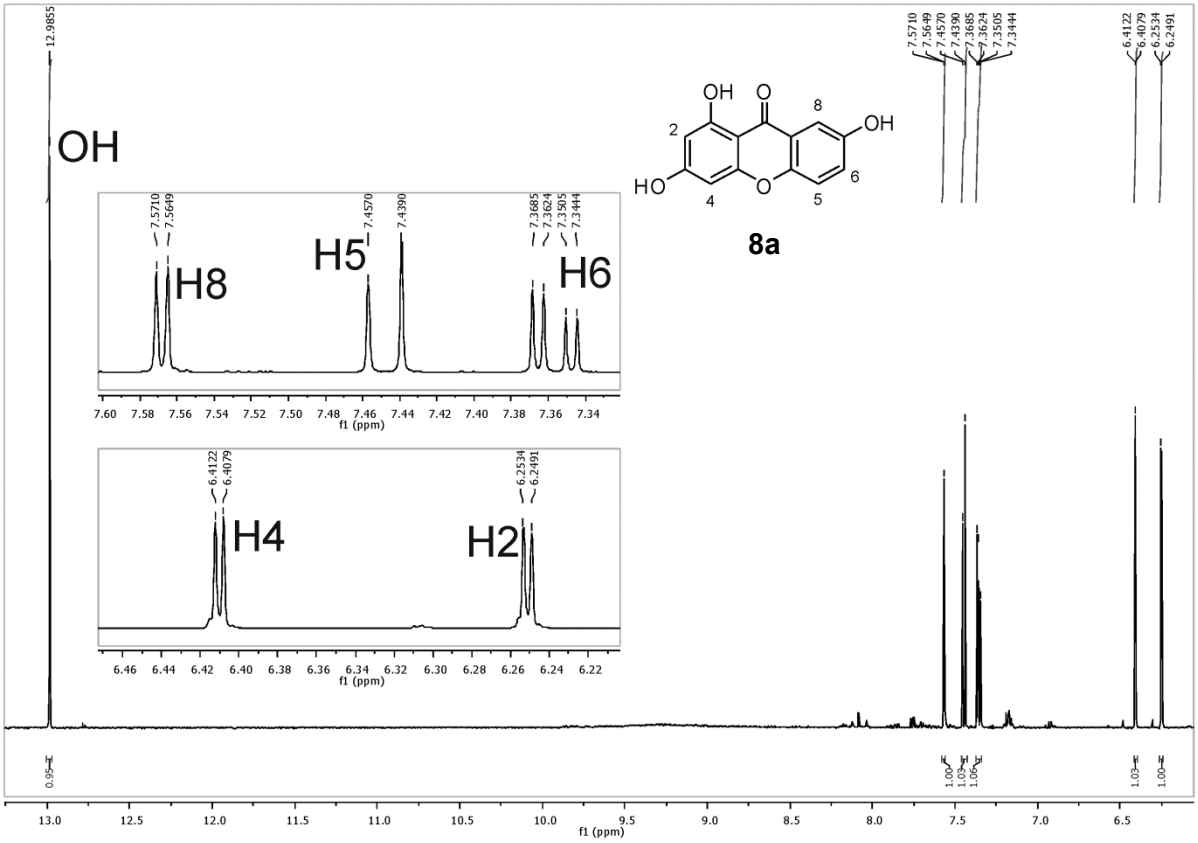


Abbildung 6-26: ^{1}H-NMR-Spektrum von 8a gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

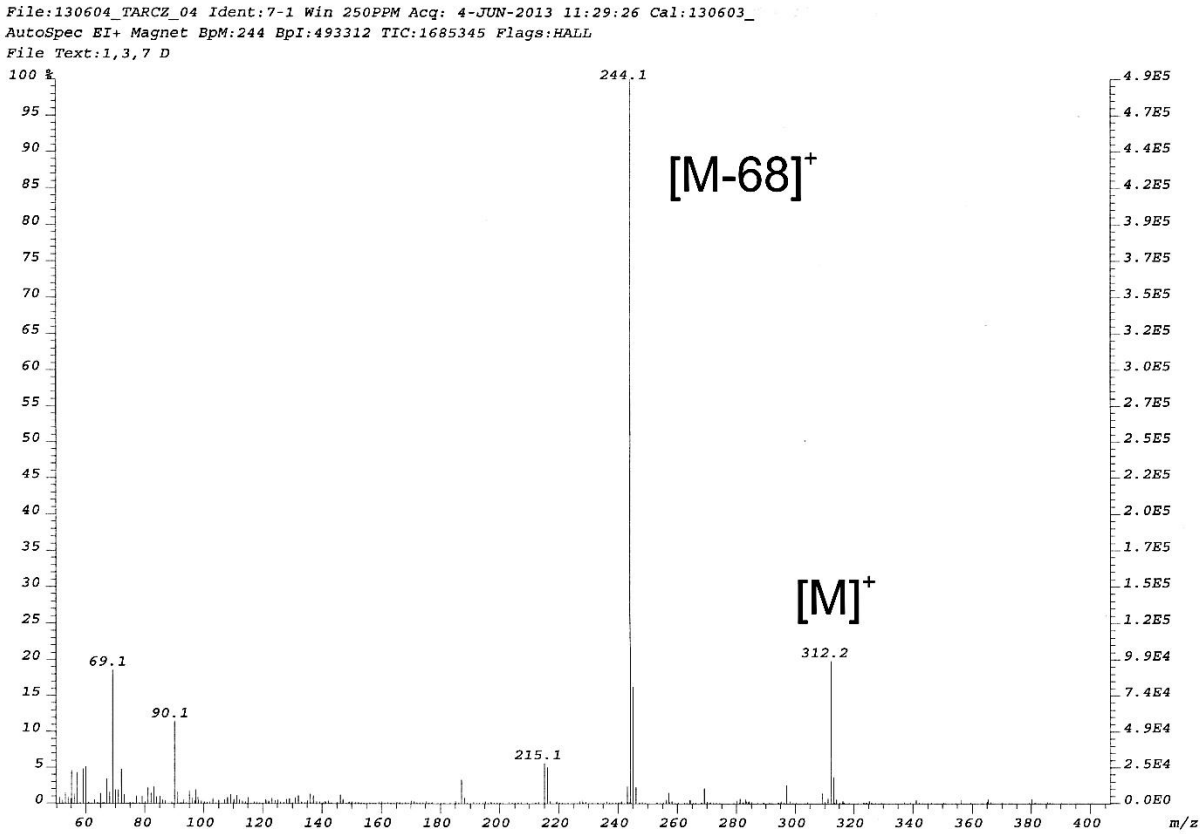


Abbildung 6-27: Positives EI-MS-Spektrum von 8b1 und 8b2 ($C_{18}H_{16}O_5$). Theoretische Masse $[M]^+$: 312,10.

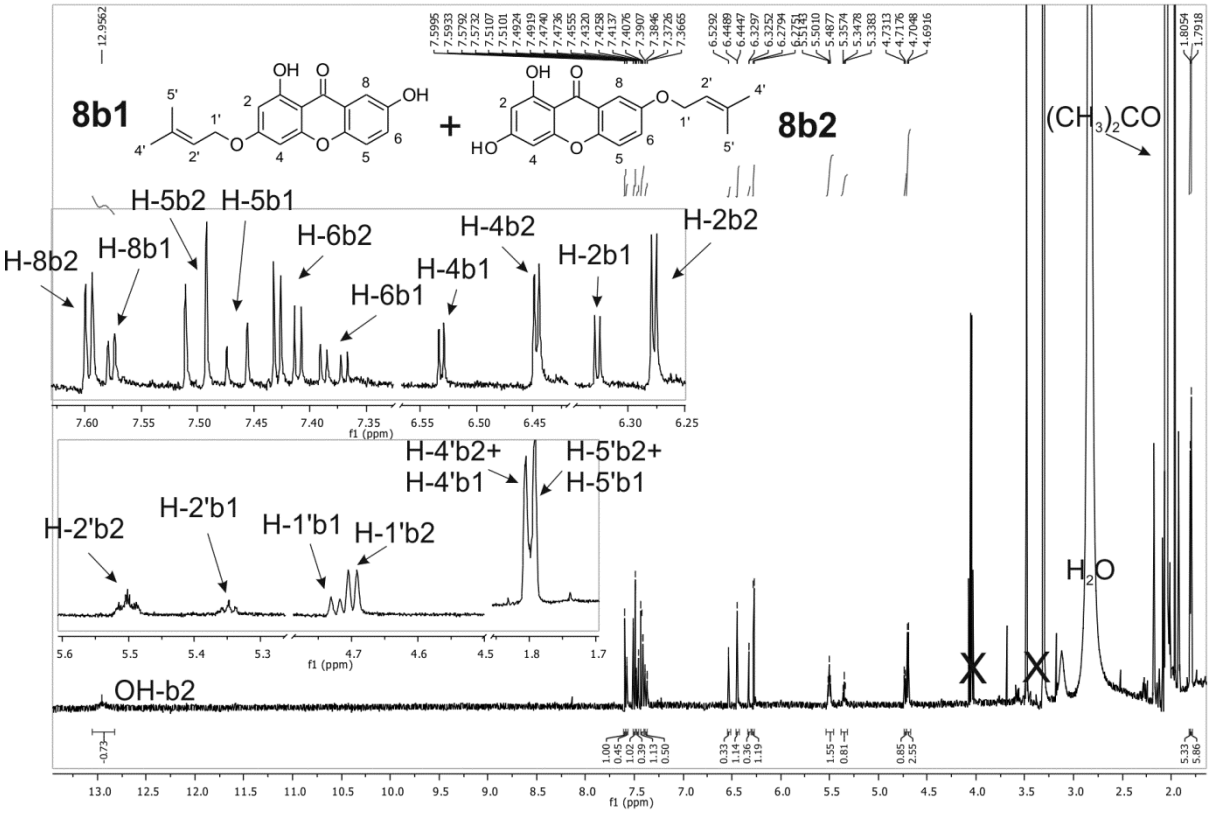


Abbildung 6-28: ^{1}H-NMR-Spektrum von 8b1 und 8b2 gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

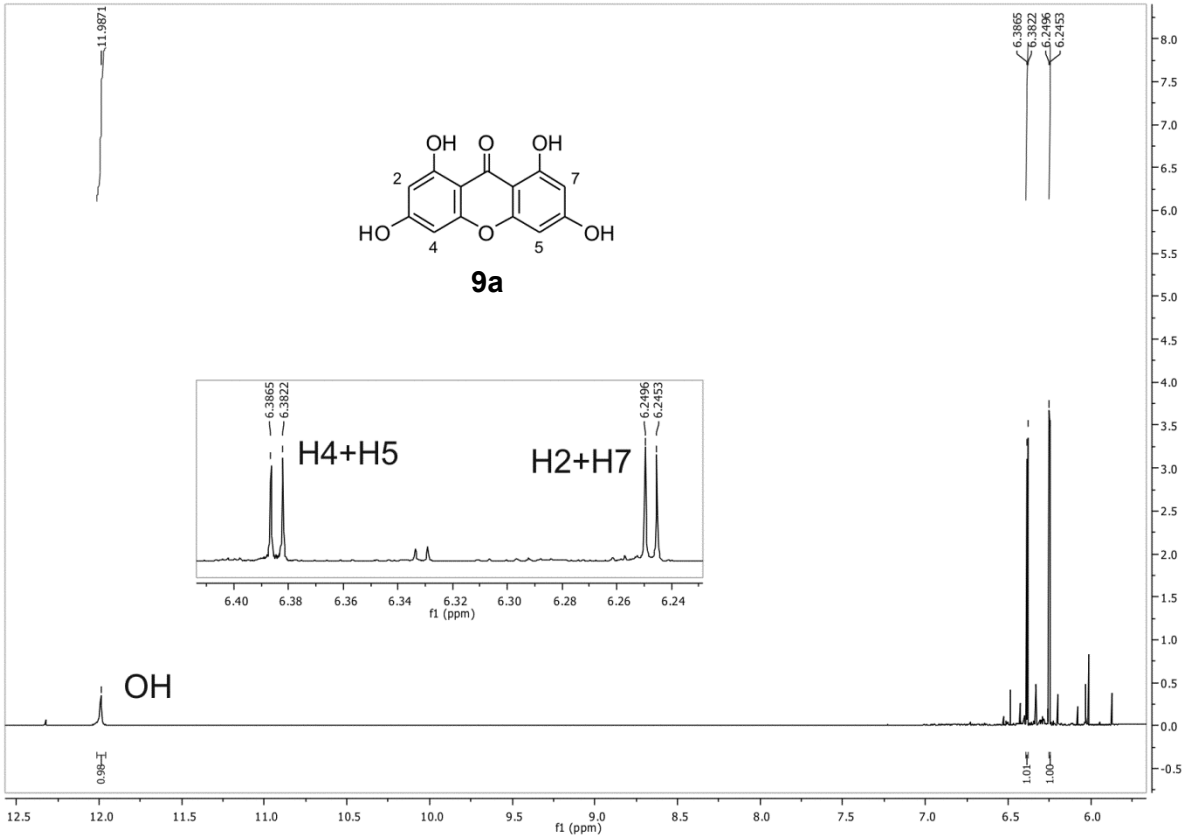


Abbildung 6-29: ^{1}H-NMR-Spektrum von 9a gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

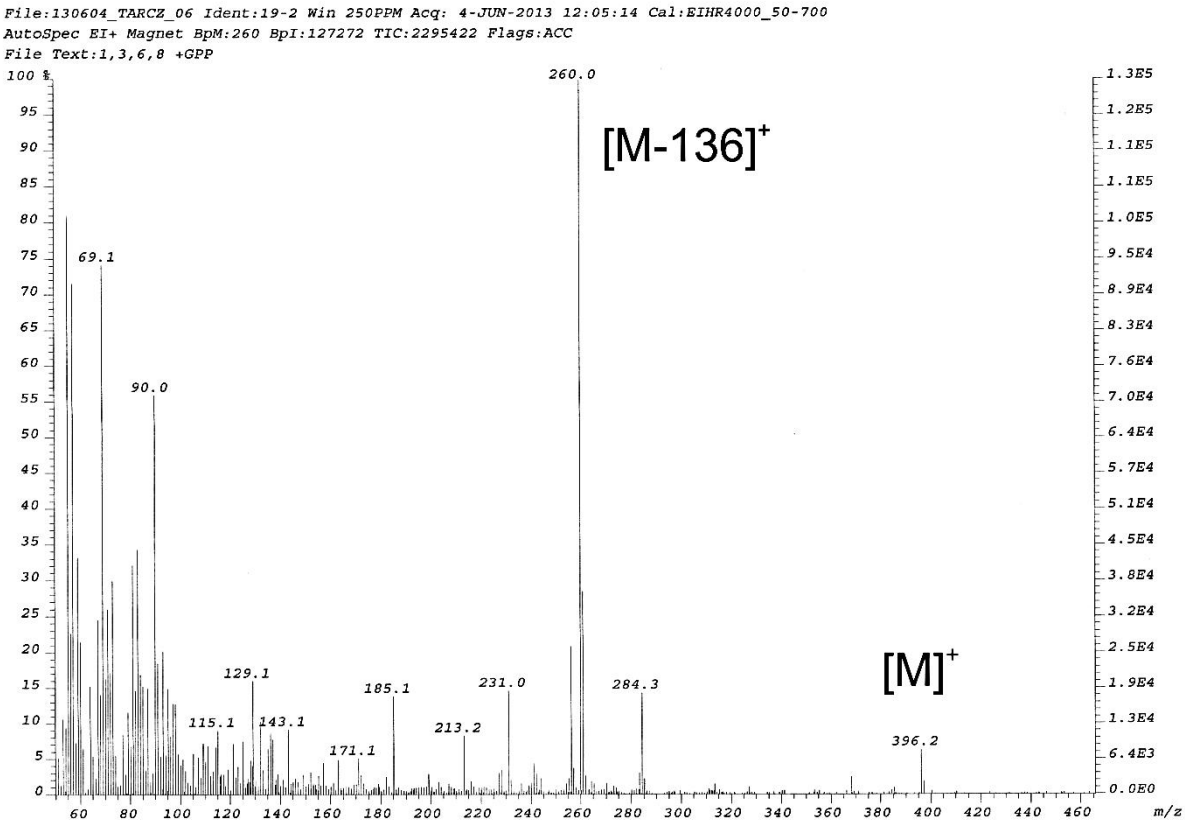


Abbildung 6-30: Positives EI-MS-Spektrum von 9c ($C_{23}H_{24}O_6$). Theoretische Masse $[M]^+$: 396,16.

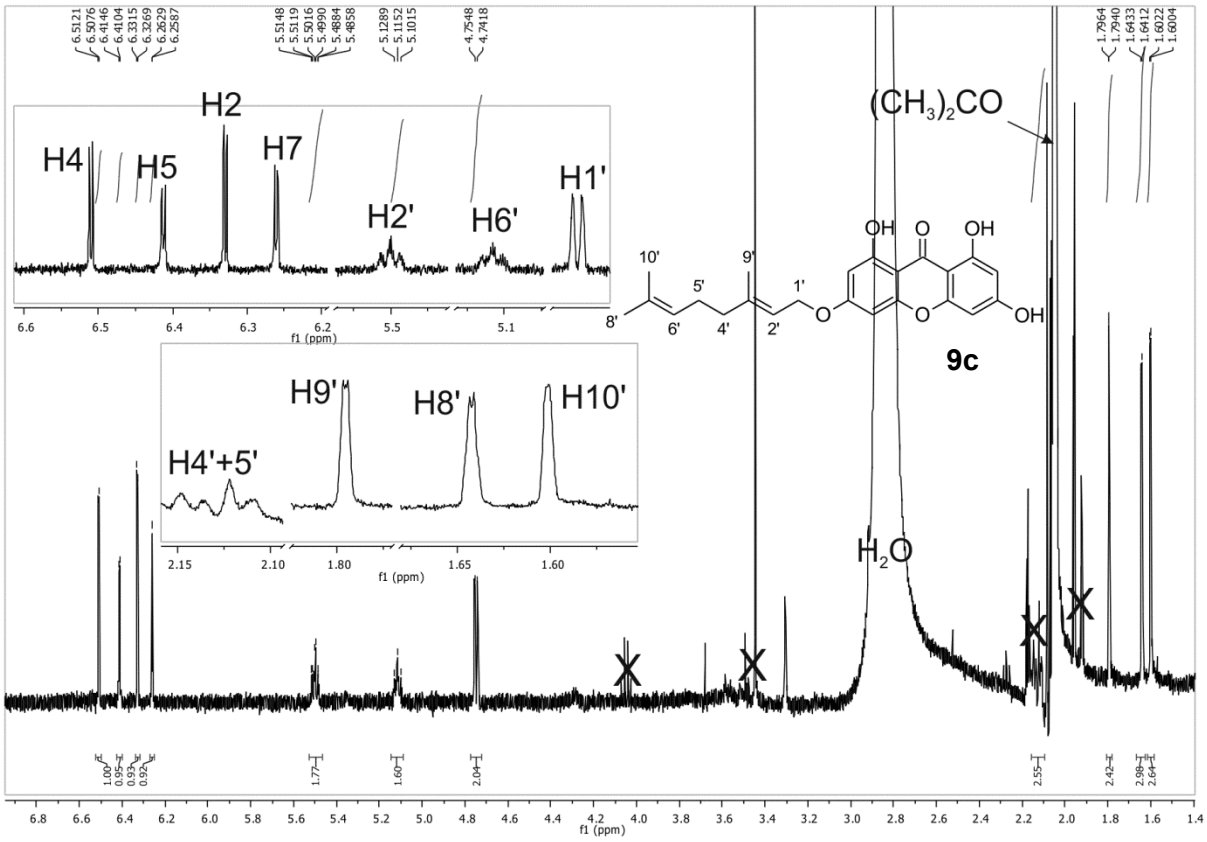


Abbildung 6-31: ^{1}H-NMR-Spektrum von 9c gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

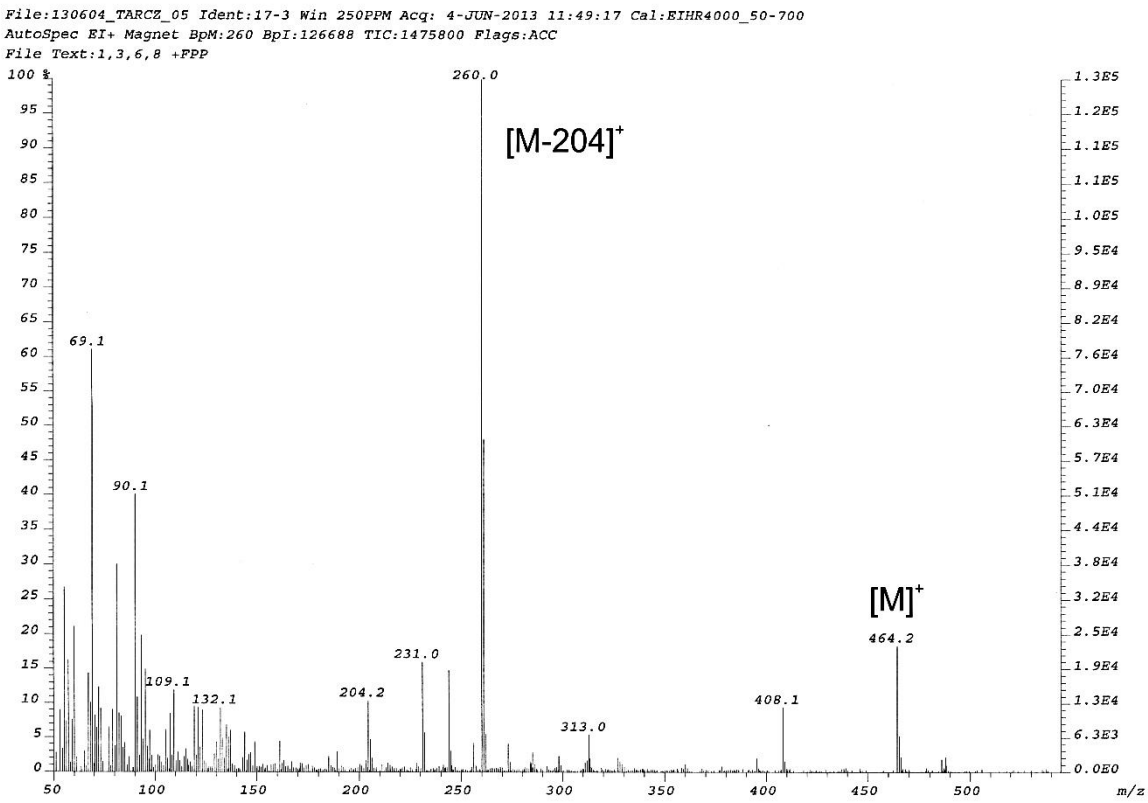


Abbildung 6-32: Positives EI-MS-Spektrum von 9d ($C_{28}H_{32}O_6$). Theoretische Masse $[M]^+$: 464.22.

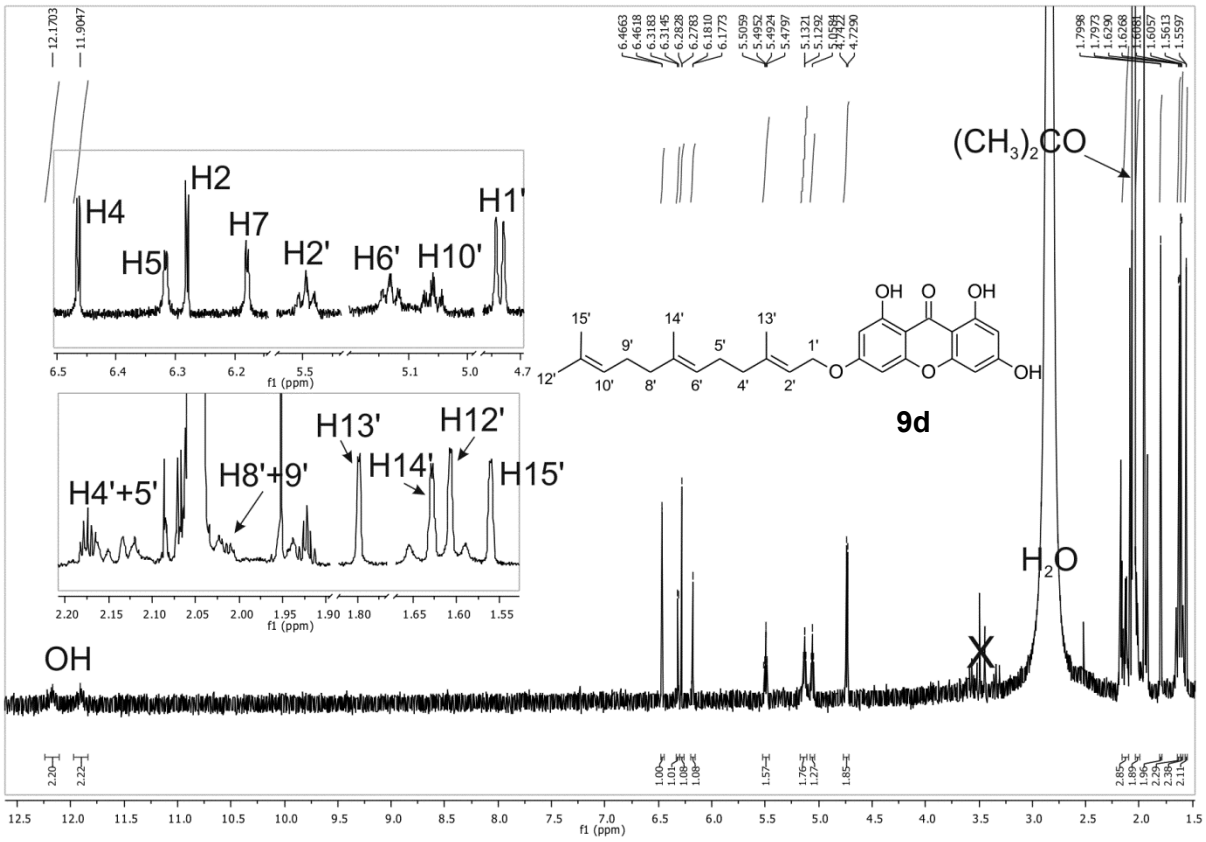


Abbildung 6-33: ^{1}H-NMR-Spektrum von 9d gemessen in $(CD_3)_2CO$ (500 MHz).

6.3. Bestimmung der kinetischen Parameter von AstPT

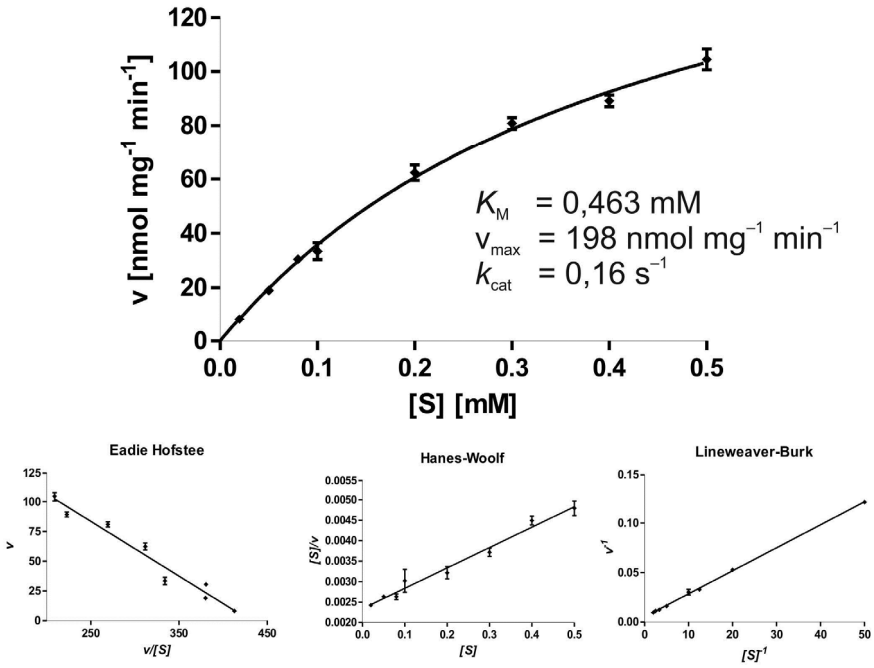


Abbildung 6-34: Bestimmung der kinetischen Parameter für Asterrichinon D (1).

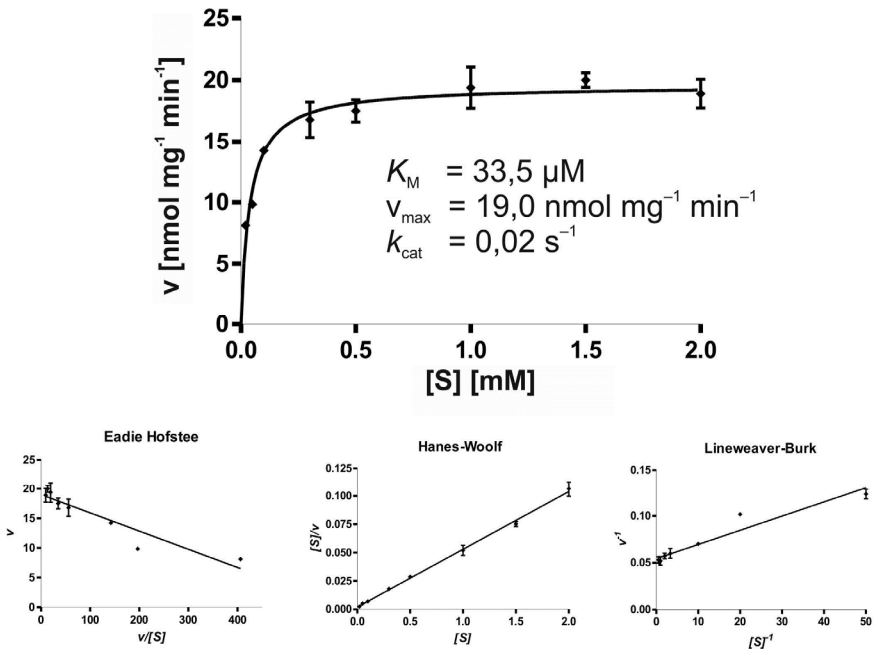


Abbildung 6-35: Bestimmung der kinetischen Parameter für DMAPP mit Asterrichinon D als aromatisches Substrat.

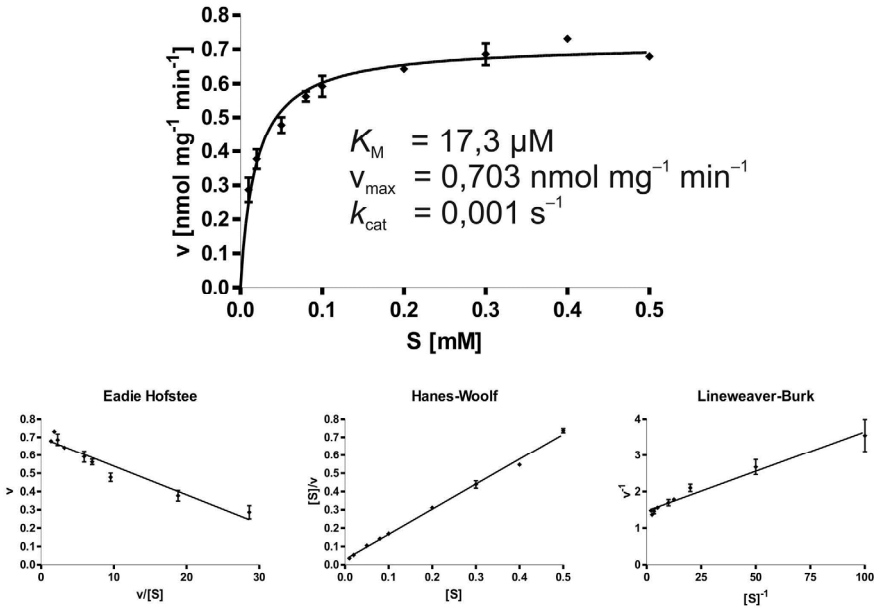


Abbildung 6-36: Bestimmung der kinetischen Parameter für 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (6a).

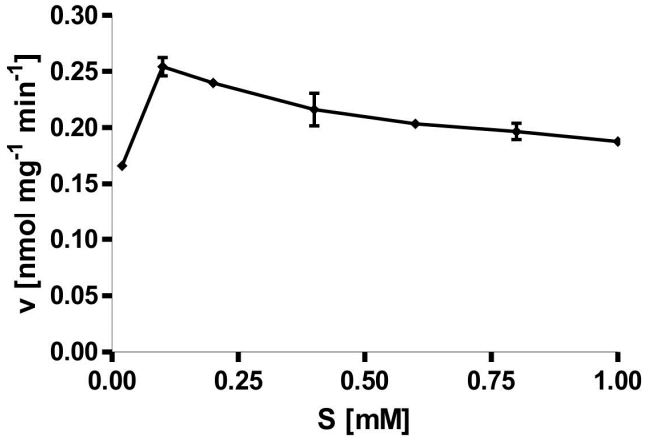


Abbildung 6-37: Bestimmung der kinetischen Parameter für 1,3,6-Trihydroxyxanthon (7a).

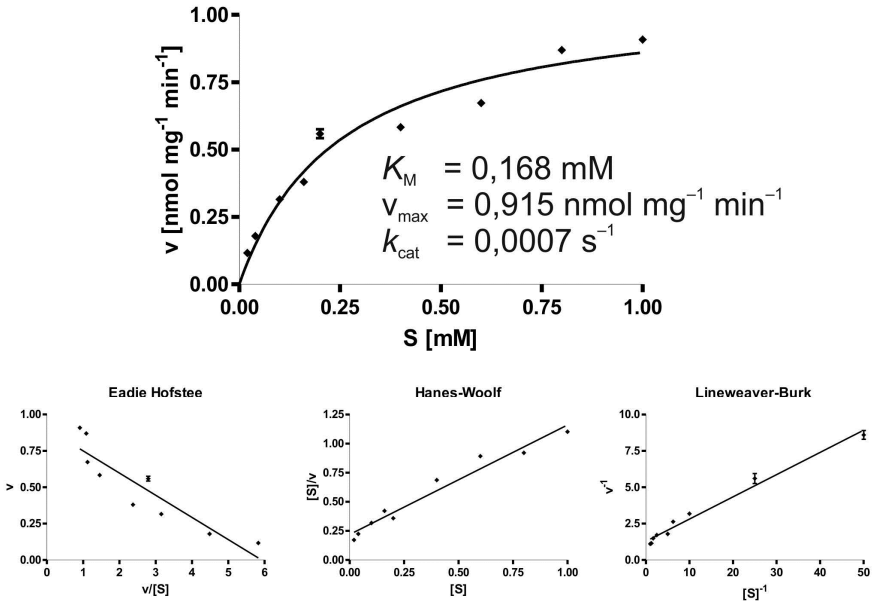


Abbildung 6-38: Bestimmung der kinetischen Parameter für 1,3,7-Trihydroxyxanthon (8a).

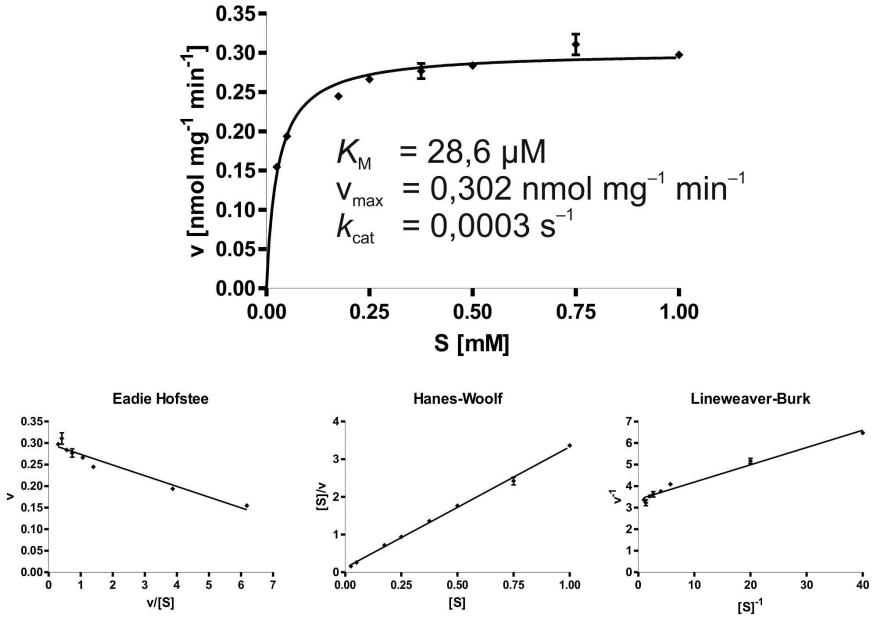


Abbildung 6-39: Bestimmung der kinetischen Parameter für 1,3,6,8-Tetrahydroxyxanthon (9a).

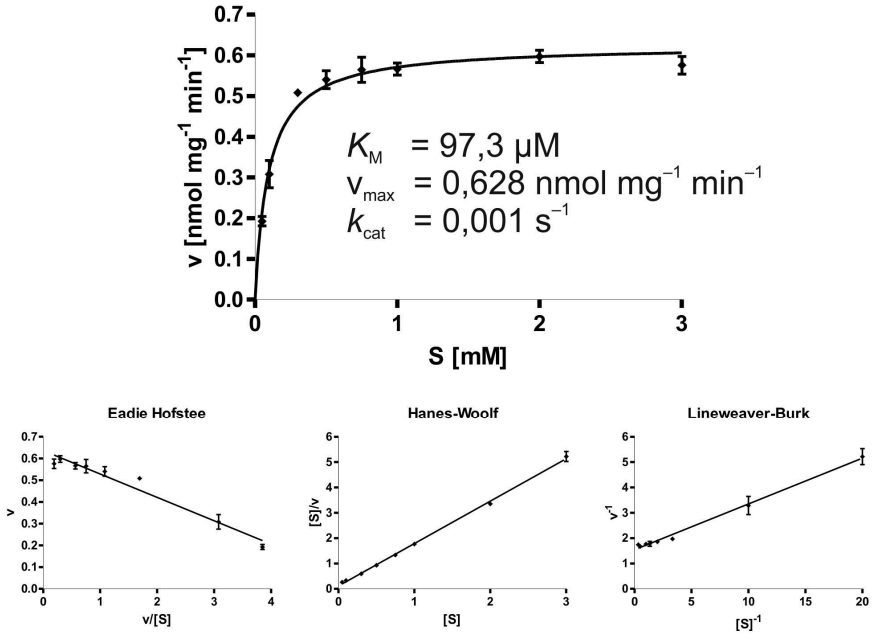


Abbildung 6-40: Bestimmung der kinetischen Parameter für DMAPP mit 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (6a) als aromatisches Substrat.

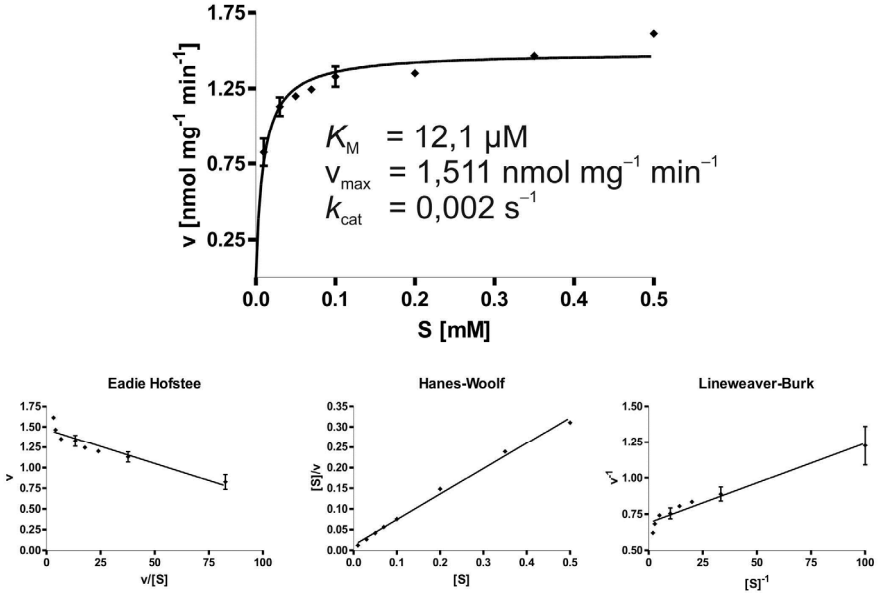


Abbildung 6-41: Bestimmung der kinetischen Parameter für GPP mit 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (6a) als aromatisches Substrat.

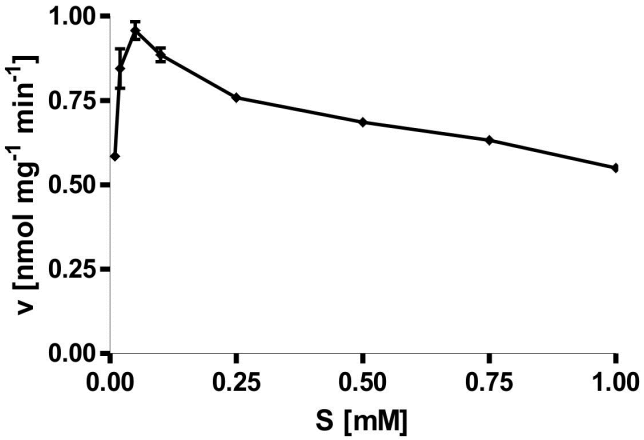


Abbildung 6-42: Bestimmung der kinetischen Parameter für FPP mit 1,7-Dihydroxy-6-methylxanthon (6a) als aromatisches Substrat.

6.4. Multiproteinsequenzvergleich von AstPT mit bekannten PTasen

```
FgaPT2      ---------------------------MKAA-----------------NASSAEAYRVLS   16
7-DMATS     MSIGAEIDSLVPAPQGLNGTAAGYPAKTQKE-----LSNGDFDAHDGLSLAQLTPYDVLT   55
AnaPT       ----------------------MSPLSMQTDSVQGTAEN-KSLETNGTSNDQQLPWKVLG   37
FtmPT1      --------------------MPPAPPDQKPC-----------------HQLQPAPYRALS   23
CdpNPT      ---------------MDGEMTASPPDISACDTSAVDEQTGQSGQSQAPIPKDIAYHTLT   44
XptB        ----------------------------------MVL-HKRSLSE---GGTSTQAWKVLS   22
TdiB        ------------------------------------------------------------   0
AstPT       -------------------------------------------------------MTIH   4

FgaPT2      RAFR-FDNE--DQKLWWHSTAPMFAKML-ETANYTTPCQYQYLITYKECVIPSLGCYPTN   72
7-DMATS     AALP-LPAPASSTGFWWRETGPVMSKLL-AKANYPLYTHYKYLMLYHTHILPLLGPRPPL   113
AnaPT       KSLG-LPTI--EQEQYWLNTAPYFNNLL-IQCGYDVHQQYQYLAFYHRHVLPVLGPFIRS   93
FtmPT1      ESIL-FGSV--DEERWWHSTAPILSRLL-ISSNYDVDVQYKYLSLYRHLVLPALGPYPQR   79
CdpNPT      KALL-FPDI--DQYQHWHHVAPMLAKML-VDGKYSIHQQYEYLCLFAQLVAPVLGPYPSP   100
XptB        QTLP-SRGP--DVDAWWQLTGRHLAVLL-DAAAYPIEKQYECLLYHYHYAAPYLGPAPRE   78
TdiB        ----------MATEYWSRHLRSVLAPLFAAAGTYSPEDQESHLAFIDEHIAPNLGPLPWE   50
AstPT       TDLPPPEAKASDTEFWSEHIRSVIGPLMKATGSYSGTAQEANLRFLDNYIAPALGPHPTV   64
                                  :  ::     *    :   *        * **

FgaPT2      S--------APRWLSILTRYGTPFELSLNC-----SNSIVRYTFEPINQHTGT-DKDPFN   118
7-DMATS     ENSTHPSPSNAPWRSFLTDDFTPLEPSWNVNGNSEAQSTIRLGIEPIGFEAGA-AADPFN   172
AnaPT       SAEAN------YISGFSAEG-YPMELSVNY---QASKATVRLGCEPVGEFAGT-SQDPMN   142
FtmPT1      DPETG--IIATQWRSGMVLTGLPIEFSNNV-----ARALIRIGVDPVTADSGT-AQDPFN   131
CdpNPT      GRDVY--------RCTLGGN-MTVELSQNF---QRSGSTTRIAFEPVRYQASV-GHDRFN   147
XptB        GAS------PPTWKSMLQLDGTPFEFSWKWNN-PGGEPDVRFGLEPIGPMAGT-SLDPLN   130
TdiB        PHGPY--------STPSSLVGSPFDPSINIV--SSGKAKVRFDFDVISPPDRT-GPDPFA   99
AstPT       AHPTY--------VAPCTIVGTLFNPSISLS--AKGKPTVRFDYDLPLPLDRASSDDPWG   114
                                     .: * .      .    *   :       .   *

FgaPT2      THAIWESLQHLLPLEKSIDLEWFRHFKHDLTLNSEESAFLAHN---DRLVGGTIRTQNKL   175
7-DMATS     QAAVTQFMHSYEATEVGATLTLFEHFRNDMFVGPETYAALR-----AKIPEGEHTTQSFL   227
AnaPT       QFMTREVLGRLSRLDPTFDLRLFDYFDSQFSLTTSE-ANLAASKL-----IKQRRQSKVI   196
FtmPT1      TTRPKVYLETAARLLPGVDLTRFYEFETELVITKAEEAVLQAN---PDLFRSPWKSQILT   188
CdpNPT      RTSVNAFFSQLQLLVKSVNIELHHLLSEHLTLTAKDERNLNEEQLTKYLTNFQVKTQYVV   207
XptB        HLAMREILYKLSSAVPGSDLTWTHHFLATLFDHDY--AKYTQK---AATMGSSIGTSLVY   185
TdiB        EGSAREILHRLADL-VGADTQWMGYLMDALYLTPAEAEVAK-----TKLPPGVAIPPSSV   153
AstPT       EGKARTLFRRLAAA-LGADTQWLEYFMARLFLSPAETEALR-----SKIPADLVIPSAMV   168
                  :                 :   :

FgaPT2      ALDL-KDGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFGSVRRLAVREPRILPPLNMLEEYIRS   234
7-DMATS     AFDL-DAGRVTTKAYFFPILMSLKTGQSTTKVVSDSILHLALKSGVWGVQTIAAMSVMEA   286
AnaPT       AFDL-KDGAIIPKAYFFLKGKSLASGIPVQDVAFNAIESIAPKQIESPLRVL--RTFVTK   253
FtmPT1      AMDLQKSGTVLVKAYFYPQPKSAVTGRSTEDLLVNAIRKVD-REGRFETQLANLQRYIER   247
CdpNPT      ALDL-RKTGIVAKEYFFPGIKCAATGQTGSNACFGAIRAVDKDG---HLDSL--CQLIEA   261
XptB        SLEF-QRKSTGLKTYFHPRKLDQQA--------FLDIP-------S-----------WEA   218
TdiB        GFDF-DGPERTLKFYIPSVRKALATGQDVSELMLKTLRGLQPLGSELVPA----MDLIAS   208
AstPT       GVAF-DDAQPRLKAWVPTMRRAILEGRSSNEIAVEVLRGLSPLGSEITPA----IDMVEA   223
            .. :        * :.                    :

FgaPT2      RGS--------------------------KSTASPRLVSCDLTSPAK---SRLKIYLLEQ   265
7-DMATS     WIG---SY---------------------GGAAKTEMISVDCVNEAD---SRLKIYVRMP   319
AnaPT       LFS---KP---------------------TVTSDVFILAVDCIVPEK---SRLKLYVADS   286
FtmPT1      RRRGLHVPGVTADKPPATAA----DKAFDACSFFPHFLSTDLVEPGK---SRVKFYASER   300
CdpNPT      HFQ---QS---------------------KI--DDAFLCCDLVDPAH---TRFKVYIADP   292
XptB        SFRGLHPN-----SPSRTAVHEFLSTNPEGKLLKPFCLSVDNCSPAK---ARLKWYFNSP   270
TdiB        YLST---R---------------------TNDAMLPLVGIDCLDPRTHKNARVKCYLHTS   244
AstPT       WIAA---S---------------------PHDPRLMLVGMDCGEPRD---SRLKIYLVTT   256
                                                :  *         :*.* *

FgaPT2      MVSLEAMEDLWTLGGRRRDASTLEGLSLVRELWDLIQLSPGLKS-YP----APYLPLG--   318
7-DMATS     HTSLRKVKEAYCLGGRLTDENTKEGLKLLDELWRTVFGIDDEDA-----------ELP--   366
AnaPT       QLSLATLREFWTLGGSVTDSATMKGLEIAEELWRILQYDDAVCS-----------H----   331
FtmPT1      HVNLQMVEDIWTFGGLRRDPDALRGLELLRHFWADIQMREGYYT-MP----RGFCELG--   353
CdpNPT      LVTLARAEEHWTLGGRLTDEDAAVGLEIIRGLWSELGIIQGPLE-----------PSA--   339
XptB        HTNFRAIREIMTLGGRIADTETRTK--QFSELFNLLKTVTEEHADFPETSEFPYVPNNGD   328
TdiB        SNSFAVVRDVLTLGGRLSDDTSLKRVETLKSVWPLLINELEGPQSDAATMDESWSKPE--   302
AstPT       KNSWATVQDVMTLGGRLDDEPTRKQLALLRKIWPYLINEPDN----TRIADENWCKPE--   310
              .    .:   :**   *  :         .:  :
```

Abbildung 6-43: Multiproteinsequenzvergleich von AstPT mit bekannten PTasen (Clustal Omega 1.2.1). Kristallisierte Enzyme sind mit fetter Schrift bezeichnet. In allen Sequenzen konservierte Aminosäuren sind mit einem Stern markiert. Konservierte Aminosäuren, die an der Substratbindung beteiligt sind, soweit bekannt, sind schwarz unterlegt. R292 in FtmPT1 ist in allen Sequenzen konserviert, spielt aber aufgrund seiner zu großen Entfernung zu den Substraten in FtmPT1 keine Rolle in der Reaktion. TdiB (ABU51603.1) und XptB (BN001302.1) sind aus *A. nidulans*, AstPT (EAU29429.1) aus *A. terreus*, FgaPT2 (AAX08549.1), FtmPT1 (AAX56314.1), 7-DMATS (ABS89001.1) und CdpNPT (ABR14712.1) sind aus *A. fumigatus*, AnaPT (EAW16181.1) ist aus *N. fischeri*.

```
FgaPT2      -VIPD-----E-RLPLMANFTLH-QNDPVPEPQVYFTTFGMND--MAVADALTTFFERRG   368
7-DMATS     -Q-NS-----HRTAGTIFNFELR-PGKWFPEPKVYLPVRHYCESDMQIASRLQTFFGRLG   418
AnaPT       ---SN-----MDQLPLVVNYELS-SGSATPKPQLYLPLHGRND--EAMANALTKFWDYLG   380
FtmPT1      -KSSA-----GFEAPMMFHFHLDGSQSPFPDPQMYVCVFGMNS--RKLVEGLTTFYRRVG   405
CdpNPT      -M-ME-----KGLLPIMLNYEMK-AGQRLPKPKLYMPLTGIPE--TKIARIMTAFFQRHD   389
XptB        SIIPNFADAPDMLKGCVYFFDIA-PGRNLPAIKVYFPVRNHCRNDLAVTQNLNRWLESRG   387
TdiB        -RLNR-----TGYSGIQYTIEIT-PGQAIPDTKIYVPLFQYTDSSEVAERNFESALKKLG   355
AstPT       -RMPR-----VGFFGLMYSLEIK-PGRPTPEVKLYVPLFQYAESWAIAENNMETVLKLLD   363
                                :       *  ::*.                :

FgaPT2      --WSEMARTYETTLKSYYPHADHDKLNYLHAYISFSYR-DRTPYLSVYLQSFETG-----   420
7-DMATS     --WHNMEKDYCKHLEDLFPHHPLSSSTGTHTFLSFSYKKQKGVYMTMYYNLRVYS-----   471
AnaPT       --WKGLAAQYKKDLYANNPCRNLAETTTVQRWVAFSYTESGGAYLTVYFHAVGGM-----   433
FtmPT1      --WEEMASHYQANFLANYPDEDFEKAAHLCAYVSFAYK-NGGAYVTLYNHSFNPV-----   457
CdpNPT      --MPEQAEVFMENLQAYYEGKNLEEATRYQAWLSFAYTKEKGPYLSIYYFWPE-------   440
XptB        --RGQYGAAFGRALETIADYRRLEDSGGLLSFLSCQFMEDGELDLTSYFNPQAFH-----   440
TdiB        NEWGLSG-KYRSVMQEIFKD----VENYGQTYASFSYTEGKGVYTTSYVAMPIKDEGGGS   410
AstPT       IDWGHSG-KYRQAMEMTFGK----GNSYGQIFVAYSYSERTGGYINSYVSMPVKDVPAHA   418
                 :   :                 : :  :        . *

FgaPT2      ---DWAVANLSESKVKCQDAACQPTALPPDLSKTGVYYSGLH          459
7-DMATS     --T-------------------------------------           472
AnaPT       --KG----NL--------------------------------          437
FtmPT1      --GDVSFPN---------------------------------          464
CdpNPT      ------------------------------------------          440
XptB        --SGRLTHRRA-TRRRGDDRW---------------------          458
TdiB        LAGDFGFRN---------------------------------          419
AstPT       FTGDYV------------------------------------          424
```

Fortsetzung Abbildung 6-43

6.5. LC/MS-Analysen von Extrakten aus *A. terreus*

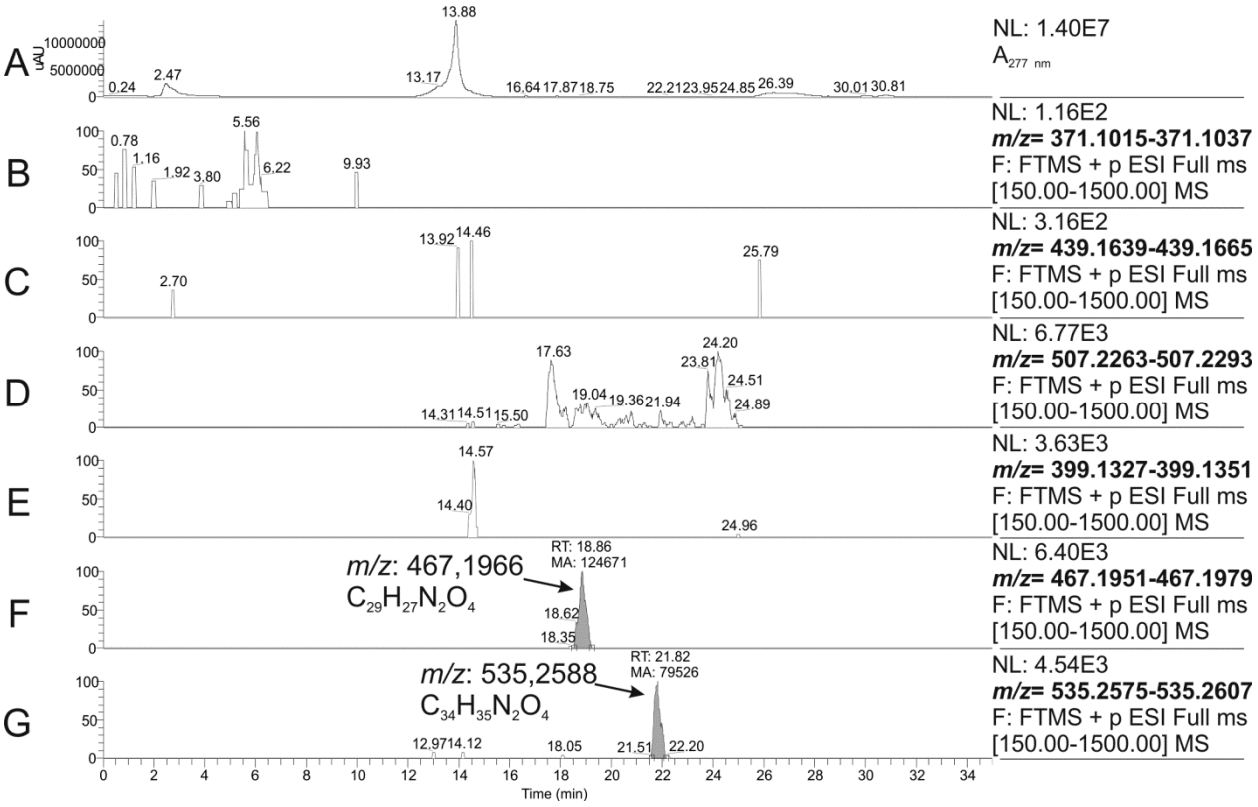


Abbildung 6-44: LC/MS-Analyse eines Mycelextraktes *A. terreus* DSM1958. Sekundärmetabolite mit Retentionszeiten von 18,86 min (*m/z* = 467,1966, F) und 21,82 min (*m/z* =535,258, G) konnten detektiert werden. Deren Massen entsprechen jeweils $[M+H]^+$-Ionen von mono- und diprenyliertem AQ D. Spuren von *m/z* = 399,13 (E) und 507,23 (D) deuten jeweils auf $[M+H]^+$-Ionen von AQ D und diprenyliertem DDAQ D hin.

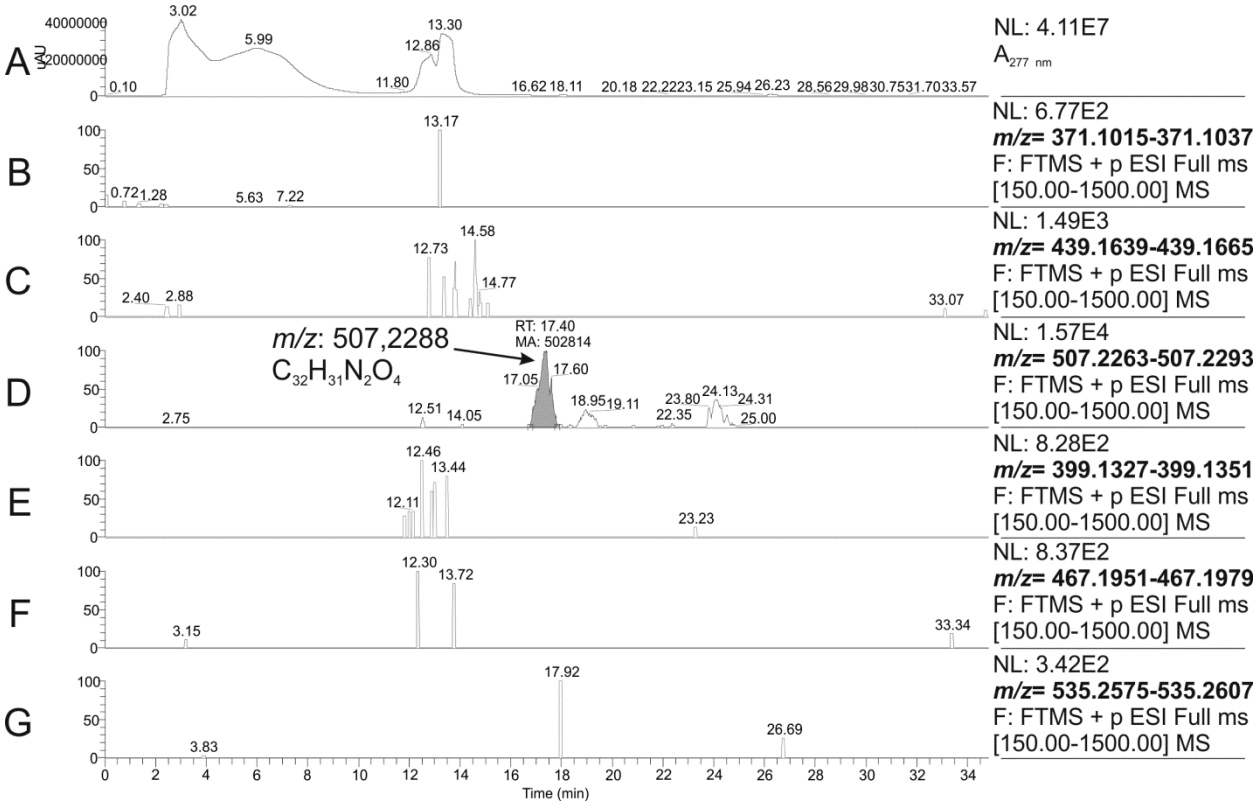


Abbildung 6-45: LC/MS-Analyse eines Mycelextraktes von *A. terreus* FGSC A1156. Der Peak mit der Retentionszeit von 17,4 min (*m/z* = 507.2288, D) entspricht dem $[M+H]^+$-Ion von diprenyliertem DDAQ D.

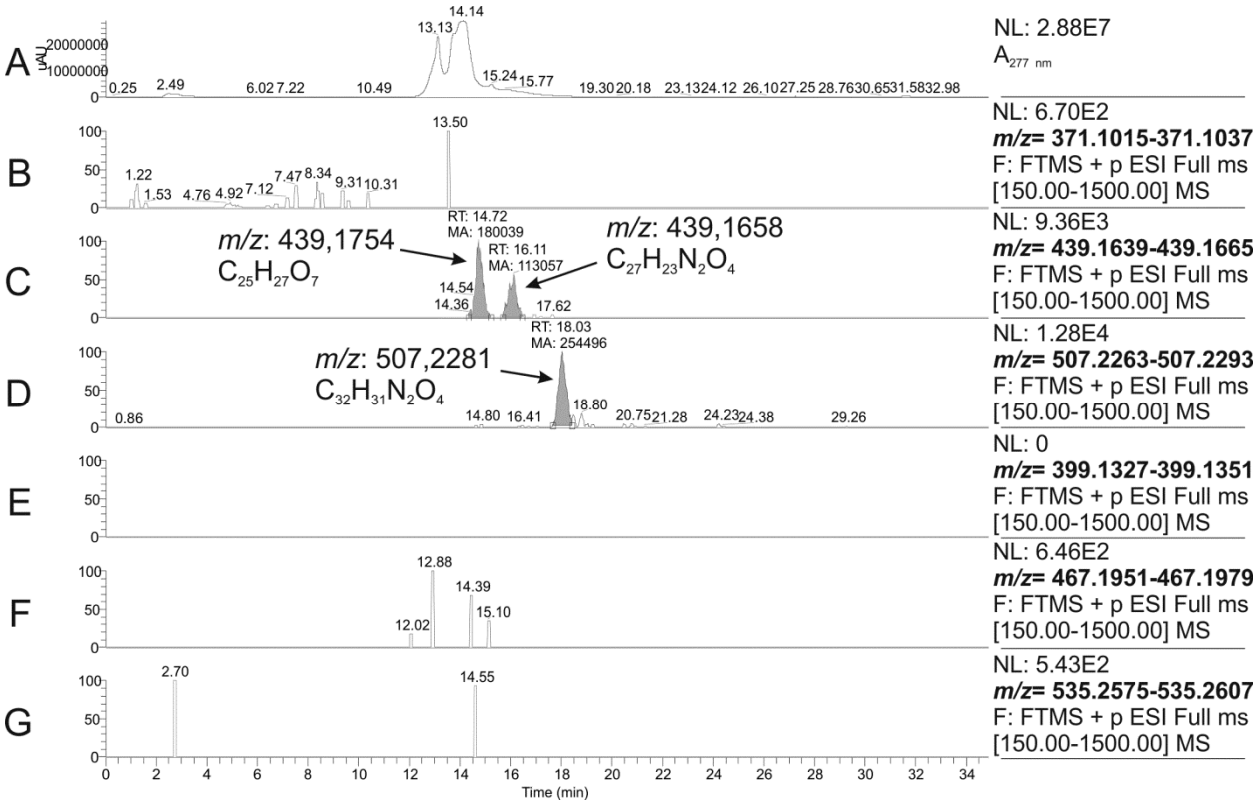


Abbildung 6-46: LC/MS-Analyse eines Kulturfiltratextraktes von *A. terreus* DSM1958. Sekundärmetabolite mit Retentionszeiten von 16,11 min (*m/z* = 439,1658, C) und 18,03 min (*m/z* = 507.2281, D) konnten detektiert werden. Deren Massen entsprechen jeweils den $[M+H]^+$-Ionen von mono-und diprenyliertem DDAQ D. Bei dem Peak bei 14,72 min (*m/z* = 439,1754, C) handelt es sich vermutlich um Butyrolakton VII, das bereits aus verschiedenen *A. terreus*-Stämmen isoliert wurde (Haritakun *et al.,* 2010).

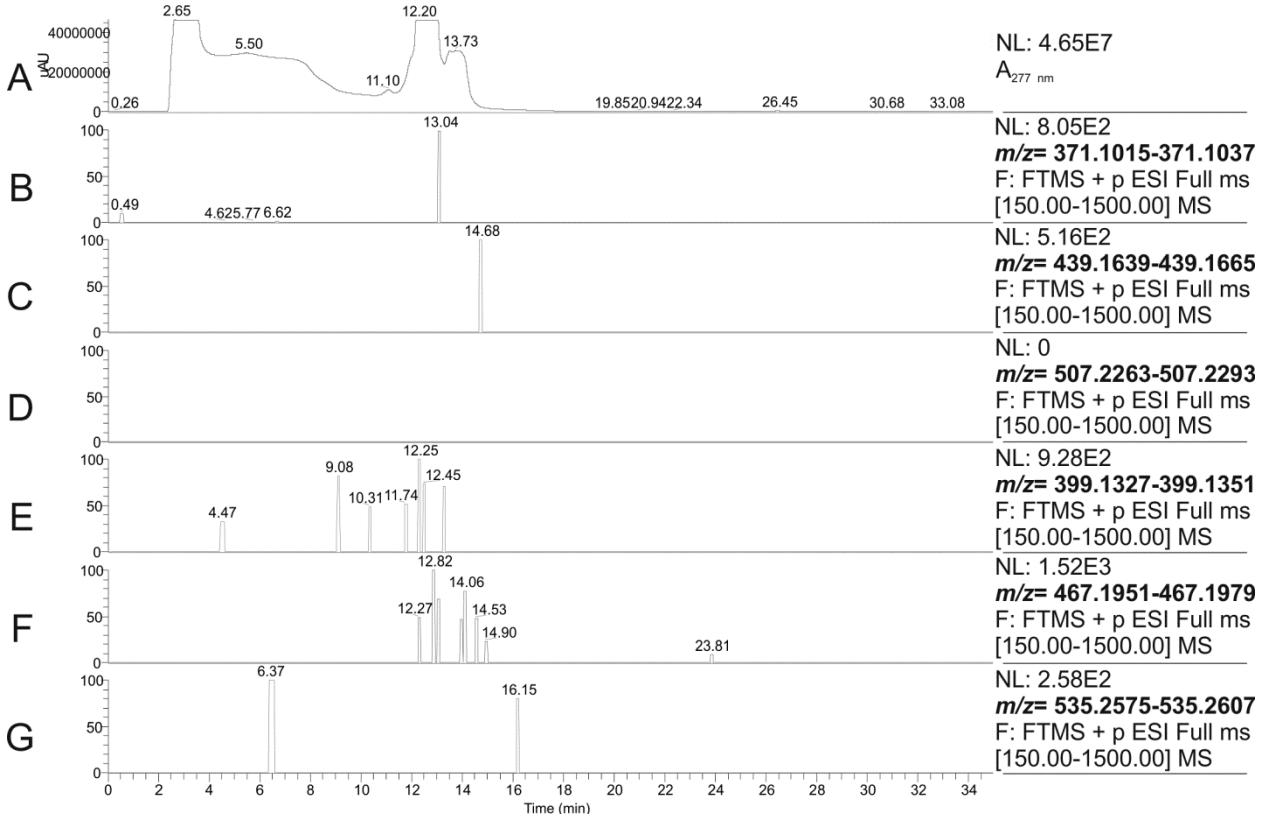


Abbildung 6-47: LC/MS-Analyse eines Kulturfiltratextraktes von *A. terreus* FGSC A1156. Es konnten keine Signale für Ionen von prenylierten oder unprenylierten Bisindolylbenzochinonen detektiert werden, die über gewöhnliches Rauschen hinausgehen.

6.6. Multiproteinsequenzvergleich von NRPS-ähnlichen Enzymen

```
GrsA            -----MLNSSKSILIHAQNKNG-THEEEQYLFAVNNTKAEYPRDKTIHQLFEEQVSKRPN     54
EAQ90367.1      MPLLDILDVISSWATTSAKPWSFLSPRSHYFV-RRSSPVPEQADVCIQDILK-ARATSGR     58
EAU36089.1      ----------------------------------------MTK-IDLINLLDHAADTVAA     19
EAU39346.1      MTR------------TEILSNGHAEP-------ASNGMVQYPF-DNVVDALRAA-ANTTE     39
EAQ91752.1      -----------------------MGS-------LAVSGVDYPF-DNIIDALKHTAAHTTE     29
TdiA            ------------------MAPSKTEI-------APLRAAKYPF-GNIVDALRHAAAHTDE     34
EAU31031.1      MNK-------------KLKLFSMPGA-------QTSQIVIMLF-QSLLHLLEAIASREPT     39
EAU36966.1      ----------------------------------------MTL-NNLQALLRRVAAREDS     19
EAU36837.1      ---------------------------------------MQP-SLIPSLLETAAARNGD     19
RalA            MTT------------VAVESSTF-----------HVQEADHFPSLTTSDLLLQAAYRYPE     37
GreA            MAS------------IAVTTTTTT-TTAEFVTSPRTSIVPE-QPNTLHDVIAQAVDSYPL     46
AtrA            MAP------------TAVFSNPATNPVANL--KASVKTAEG-VPATLNDLLLQATEMYPS     45
                                                                   :

GrsA            NVAI----------VCENEQLTYHELNVKANQLARIFIE-KGIGKDTLVGIMMEKSIDLF    103
EAQ90367.1      GSVFFYPR----GNTSTLAKLSYQELHARACDYSRVVRRLPAFKEGHPVLLHLDEHRDTI    114
EAU36089.1      SGILIYSP----GNVESPHRLTYAELRDAAQQNARRLGCMEGFAPGSLVLLHLDGYRDNM     75
EAU39346.1      G-IIAYQTNNSGSETTPAQHISYKELLRTAEANAALLQSKHLTTPKQPVVVHSDNAVDSM     98
EAQ91752.1      G-IISYSPAGA-GEAPVARTVSYRELLDTAEANAGKLQKLSATKTGSVVLVHFDDALESI     87
TdiA            G-IIVYHPNSI-STSSPPQTVSYKDLLHQAEANATRLLQQKLCSPKSIVLVHFESALDSI     92
EAU31031.1      RYIITYSI----GNTHTPEIFSYSDLLQSARKAAGALRFKYHVVPGSVVLLHFNDHWNSM     95
EAU36966.1      GHVVVYGM----GNTKAFKSYSYQDLLRVAIKASVALRKTSDLHPGSVILLHFDNHWDNI     75
EAU36837.1      GRVILYSQ----GNREDPRSITYRDLLETASKASVAVHNHQNYTPGAAVLLHFNNHLDNI     75
RalA            SGLRFVDD---HGAGE-VDCLSYFKLLQEAKCILAELRV-LGRRPGDKVVLLLERARDFV     92
GreA            HELGFITS---SAHDSSIQTKTFSAFNQYVRNLARAMLE-WGKPTGSVVVVYLTEHEDNM    102
AtrA            HELSFITS---SAHDSSVQARTFQDFNQRVRNLASALAA-WKKPAGEVVVVYLTEHEDNM    101
                                  ::  :   .      .           : :      : .

GrsA            IGILAVLKAGGAYVPIDI----EYPKER---IQYILDDSQARMLLTQKHLVHLIHNIQFN    156
EAQ90367.1      LWFWAILLANGVPVLSSP--FSNVDEHRHRHIQGLSNLLESPICITASGLL-----HLFD    167
EAU36089.1      IWLWSLIYAGCIPVMSTP--FAHHEEHRRSHLLHLQSLLRDPICLTRQGLE-----AQFP    128
EAU39346.1      IWYWSVLLTGAIPTMTGPGMFSQDAVERKKHLLHLHRTLDAPLCLTRRALM-----GPFN    153
EAQ91752.1      VWYWSVLLAGGIPAVTSPAMFSQNEADRQKHLNHLYKTFNGPLCLTRRALL-----EPFE    142
TdiA            VWYWSVLLAGGIPALTGPGMFSQNPADRERHLRHLSETLNSPVCLTRPALL-----APFE    147
EAU31031.1      LWFWATLIADCIPAMSTP--FSNNPETRLRHLKHLSTTLRSPKCLTTASLA-----AEFA    148
EAU36966.1      VWFWAASFAGCLPAISAS--FSNDASQRTAHIERLSTTLMHPLCLTNERIM-----ADFA    128
EAU36837.1      VWFWAVLLAGCIPAITPA--FSNNPVQRVANLEHLSSTLITDWCLTSQALL-----VEFA    128
RalA            PAFWACVLGGVIPCPVAP--IRHDPMRWQKTLEHIDALLDSPLFITTHTLK-----AGLP    145
GreA            TAVWACLLAGFVPCLQPA--LSAQQAHKEGHVAHIKNLFGSATWLTSELGA-----EQIN    155
AtrA            SAVWACLLAGLVPCLQPA--LSAQQEHKEGHIAHIRKLFGSATWLTNDAGA-----MQLD    154
                    :                          :  :         :*            :

GrsA            GQVEI-----FEEDTIK---------IREGTNLHVPSKSTDLAYVIYTSGTTGNPKGTML    202
EAQ90367.1      GPHSL---DLHTIESLDNLATSSPTSPSEPPPTTKWPGGPTLAILMLTSGSTGNAKAVRI    224
EAU36089.1      PDVGF---RLCNIESISGGSNP-FTSPRLGQPPGQDDNVDDIALLMLTSGSTGHAKAVPL    184
EAU39346.1      ENAGL--LQCLAFEDLSPSPDG----SNASLPPSINPSPMDVAALMLTSGSSGTAKAVPI    207
EAQ91752.1      EHASEKRIDTLAVEDFDKEPAA------TSTRRAFKPSAADVVALMLTSGSSGNAKAVPL    196
TdiA            EQTADDRIKARTVDEILAAPEI-AD-VADAPLPALTPSSTDMLALMLTSGSSGNAKAVPL    205
EAU31031.1      GQEY---ITPICVQSLDYENLV-HL---------PIKEGGDIAVLMFTSGSSGHCKVVPL    195
EAU36966.1      GQDA---VQPLAVETLVLNGDV-SF-E-ALPQEHPEPSLSDDALLLFTSGSSGNSKGVCL    182
EAU36837.1      GQDA---IEPVSVETLGWEKAS-PD-S-NT--ASVKAKPTDTALLLFTSGSTGKSKAVCL    180
RalA            D--TM---EVVTLDALR---HA---HSVSPLVPVHPARVNDPAVFVLTSGSTGNSKAVVL    194
GreA            SISGL---EVHLLSELKSSAEK---FTVAADWVAYEAKPDDEAILFLTSGSTGFSKAVVH    209
AtrA            TIKGL---DVHLFSDLLASAEK---SSVAANYVARQSQPDDEAILFLTSGSTGFSKAVVH    208
                             . :                           .. ***::*  * .

GrsA            EHKGISNLKVFFENSLNVTE-KDRIGQFASISFDASVWEMF-MALLTGAS-LYIILKDTI    259
EAQ90367.1      SHRQILAAIAGKASVRPLPP-DKPFLNWIGLDHVASLVEMHIQALWLGVDQIHVHAADVI    283
EAU36089.1      THSQLLSALAGKERFLQLRQ-HGPSLNWVAFDHIASLAEMHFHPIFACIDQVHVAAADVI    243
EAU39346.1      THQQVLAALRGKTAVAQLSHPTSPFLSWVHMDHVANLVHCHLFAIVAGVSQVQVPAANVL    267
EAQ91752.1      SHEQLFAAFRGKTEAANLTFPDSPFMSWVNMDHVANLVHCHLFAIASGVSQIQVPAANVL    256
TdiA            THQQLLAAFRGKSTAASLRFPRSPFLSWVHMDHVANLVHCHIFAIVSGISQIQVPAPDLL    265
EAU31031.1      THEQILASLSGKAWTFPLPD-NTAQLNWVGMNHVASLVEVHLFSIYTHSDQVHIPTVEVL    254
EAU36966.1      SHGQILASISGKYAVRPLPD-NTSFLNWVGLDHVAAIVEIHLQAMYALKTQVHVPAADIL    241
EAU36837.1      SHFQIVSAIAGKLSVVPLPE-QSSFLNWVGLDHVAAIIEIHLQALYADLDQVHVPGSDVI    239
RalA            THGNLLASMAGKNGYQRLGS-DDVTLNWISFDHVAALLEAHLLPLSVGAAQIHVDSAPIL    253
GreA            THRTILAACRAKGQSYGLTS-ESQVLNWVGFDHVAGSLEMHITPLLYGASQLHVHASAIL    268
AtrA            THRTIINACIAKGANYRLTP-QTNILNWVGFDHVAGSLEMHIAPLLYGCSQLHVHASAIL    267
                 *  :            :        .:  :.. *   . .   :      : :     :
```

Abbildung 6-48: Multiproteinsequenzvergleich von GrsA mit TdiA und Homologen (Clustal Omega 1.2.1). In allen Sequenzen konservierte Aminosäuren sind mit einem Stern markiert. Aminosäuren des NRPS-Codes in GrsA sind schwarz unterlegt. GrsA (CAA33603.1) ist aus *Bacillus brevis*, TdiA (ABU51602.1) ist aus *A. nidulans*, EAU39346, EAU36966, EAU36089, EAU36837 und EAU31031 sind aus *A. terreus*, EAQ90367 und EAQ91752 sind aus *C. globosum*, RalA (AEC03968.1) ist aus *Ralstonia solanacearum*, GreA (AFB76152) ist aus *Suillus grevillei*, AtrA (ACH90386.1) ist aus *Tapinella panuoides*.

```
GrsA            NDFVKFEQYINQKEITVITLPPTYVVHL---------------DPERILSIQTLITAGSA          304
EAQ90367.1      AAPHTFLDLLSRHGVARTFAPNFFLARLVATAPPAEGDQGRNKKRWDLSGLTVVASGGEA          343
EAU36089.1      TDPLILLELIHRHRVGITFAPNFLLAKLLDSLE--REPS-PSSRPWDLSCLMHLLSGGEA          300
EAU39346.1      VDPMQLLNLLSRHRVSRTFAPNFLFAKLRRQFD--AGRTD-SLDADLNLAALYLDTGGEA          324
EAQ91752.1      VDPAQLLNLISRHRVSRTFAPNFLLAKLRRQLE--AGKTD-TLDADLNLQTLFLDTGGEA          313
TdiA            INPAQLLNLISRHRVSRTFMPNFLCAKLRRQLE--SGSPEYILDPGLNLETLYIDTGGEA          323
EAU31031.1      SHVTLFLDLIHRHRVSRTFAPNFFLAKLRAALS--ADDTLAK-YTGSLSNLRYIVSGGEA          311
EAU36966.1      SSPATFLQLLEKHRVSRTFAPNFFLAKLRDLLQ--ENDSLPEPRRWDLRSLEYVASGGEA          299
EAU36837.1      SDPIWFLDLMATHRVSRTFAPNFFLARIRDALV--QNARSASPRQWDLSGLRYVASGGEA          297
RalA            SDPLLFLRLISDHRVSMTFAPNFLFGQINAALQAKDAQAQ-AKHSFNLSRLRHIISGGEA          312
GreA            ADPLRLLRLIDEKSIELAFAPNFLLSKLTRDLEKR---TD-LFGSFDLSSIKRINSGGEA          324
AtrA            SDPLLLLRLIDERSIDIAFAPNFLLAKMVRDLEKR---TD-LHGKFDLSSLRRMNSGGEA          323
                     :   :  : :     *     ::                          : :.*.*

GrsA            TSPSLVNKWKEK-------------VTYINAYGPTETTICATTWVAT-----K--ETI-G          343
EAQ90367.1      NDVKTAAAASAL-FERYGARR----NVITPGFGMTET--CAGAIYNT-ACPDYDIQRGGR          395
EAU36089.1      NVVDTCARLARRLTQDYGVPS----TCIKPAFGMTET--CAGCSFND-RFPTYETVHM-L          352
EAU39346.1      NVIDVCAGLQPI-LARYGAPA----DVFKPSFGMTET--CAGCIFNS-HCPSYDQARL-H          375
EAQ91752.1      NVIEVCAALQPL-LARYGAPA----DVFKPSFGMTET--CAGCIFNT-ECPSRDQANK-S          364
TdiA            NVTEVCIALQSL-LSRYGAPD----NVFKPSFGMTET--VAGCIFNS-HCPSYDHAQR-H          374
EAU31031.1      NVTQTINDLAQM-LKKCGAVS----NVIVPAFGMTET--CAGAIYNT-SFPQYDVEHG-L          362
EAU36966.1      NVTKTCDRLSEY-LVAFGAPK----DVIVPGFGMTET--CAGSIFNT-RCPEYDKSRS-A          350
EAU36837.1      NTTKTCDELSQL-LKSFGAPL----NVIVPGFGMTET--CAGAIFNT-NCPDYDKKHG-L          348
RalA            VVVETGHRFIEL-LAPYGLVA----SALWPAFGMSET--CAGSIYSR-NFPDGDQR---R          361
GreA            VVSKTAQAFAAT-MKQLSKNPSAVSFVISAGFGMTET--CAGCIYDPVDVLKNKPA---H          378
AtrA            VVSKTAVAFVQL-LKKLGRNPSKVSFKVAAGFGMTET--CAGCIYDVVDLAENSPK---H          377
                   .                            .:* :**   *

GrsA            HSVPIGAPIQNTQIYIVDEN--LQLKSVGEAGELCIGGEGLARGYWKRPELTSQKFVDNP          401
EAQ90367.1      AVASVGKCMKGIEMRVVVGS---RRAVADEPGDLEVRGEVVFDGYYRNEKATVDAFP---          449
EAU36089.1      DFASLGRGVKGVQMRVTSLSTGQPVDDHSEVGNLELSGPSVFRGYYNNSQATRDSFT---          409
EAU39346.1      EFASLGTPMPGVRMRISRLDGSG-EAAPGERGHLEITGEAIFHGYYNNPTATADAFT---          431
EAQ91752.1      EFASLGQCMPGVQMRISRLDGAG-DAATGERGSLELKGDIIFKGYYNNTTATTDAFT---          420
TdiA            EFACLGKPMPGVRMRVTRLDTPSEEAAPGERGSLEVTGEVVFKGYYNNPAATAEAFT---          431
EAU31031.1      PFASVGSCMPGIQVRIVQLNGNGNSVPPGTVGNLEICGPVVLKGYFNNPAATKSTFT---          419
EAU36966.1      EFASVGTCMPGISMRVTDLS--NNALPSGEIGHLQLTGPVVFKRYFNNTSATQEAFT---          405
EAU36837.1      EYTSVGSCMPGIFMRVTNQQ--GDPLPPGEMGSLELAGPVVFRQYLNNPAATQESFT---          403
RalA            EFASLGYPVAGLQIRVVDES--GAPLPDGETGELQLRGPMVFGHYHKNEEATRQAFT---          416
GreA            EFLDLGRPINGCEMRIVDPEDGATLRPDGESGELQVRGPMVFVRYYNNAEATSSSFV---          435
AtrA            EFLALGAPVHGCEMRIVDPEDGATPRSDGQPGELQVRGPMIFVRYYNNPEATKSSFV---          434
                    :*  :    : :   .           * * : *  :   * ..   * . *

GrsA            FVPGEKLYKTGDQARWLSDGNIEYLGRIDNQVKIRGHRVELEEVESILLKHMYISET---          458
EAQ90367.1      --SPGGWFRTGDQACLDGRGNLCLIGRASEVININGIKVVAADLDSLLEQTL--GSRVAR          505
EAU36089.1      ---PDGWFRTGDLAMIDAGGQLVLRGRSKELICINGAKYLPHEVESAIEDAKVRGVTPGF          466
EAU39346.1      ---ADGWFRTGDLAYIDAGGHLHLDGRTKEMVNINGVKYLPHELDAALEQAEIPGATPTY          488
EAQ91752.1      ---ADGWFRTGDLAYLDASRCLHLDGRTKEMININGVKYLPHELDASLEQAEIPGATPSY          477
TdiA            ---SDGWFRTGDLAFIDSNGNLHLDGRTKEMININGVKYLPYELDAALEQAQIPGATPSY          488
EAU31031.1      ---NDNWFKTGDLAFVDDNGMLVLAGREKDSIIVNGANYSPHDIESAIDEANIPGLISGF          476
EAU36966.1      ---PDGWFKTGDMGCIDENGCLTLTGRAKENMIINGVNHSPHEIETALD--KIPGLTPSY          460
EAU36837.1      ---MDGWFKTGDCGTLDENGYLVLGGRAKETIIINGVKYSPHEIETAVEEHNIKGLSRSF          460
RalA            ---EDGWFRSGDLGQIH-GGQLRLVGRSKDSIVVSGANYFSHELEVALEQLD--GIERSF          470
GreA            ---EGGWYRTGDVGIIE-NGVMRLSGRIKDTVIVHGVSYGIPELETYLQTVE--GVTHSF          489
AtrA            ---EGGWYRTGDIGIIE-NGNMRLSGRIKDTVIVHGVSYGIPELETYLQTVQ--GVTHSF          488
                       :::** .       :   ** .: : : *      :::  :      .

GrsA            -------AVSVHKDHQEQPYLCAYFVSEKH---------IPLEQLRQFSSEELPTYMIPS          502
EAQ90367.1      FVVFPTR--AVHTEQITICYVPPSWPHTVED---MVAVDDLAARVCITSASARP-LVFSL          559
EAU36089.1      TICFGYRPAKAQTESLAVVYLPAYEEADVES---RSQAQNAIIRVGLIMTGTRP-YVLPL          522
EAU39346.1      FCCFGTRTAAMDTEVVAVLYLPAYDEADDAA---RFDAQSSIIRLISMYTHSRP-RVVPL          544
EAQ91752.1      FCCFGTRDAGMDTEAVAVLYLPSYDLSDDAA---RFETQRNIARVVSLHTRSRP-RVVPL          533
TdiA            FCTFSSRDATMDTEVVVVLYLPSYVESDDEA---RFSTQSSIIRVVAMHTRSRP-RVVPL          544
EAU31031.1      TCCFSTFPPSADTEEVIIVYLPNYTPADTVR---RSETAAAIRKVAMMSVGVRA-TVLPL          532
EAU36966.1      SCCFSFFPSGGETEEICVVYLPTYSPDDLAA---RAQTADAISKTVLMSTGSRP-HVLPL          516
EAU36837.1      TCCFSSLSPGAETEEIVLVYLPTYAPEDIPA---RAATADAISKVVLMSTGSRP-HIIPL          516
RalA            VAAFPTRPKGVDTELLVVIFATTIPLNDEAR---LHQLNVAIRNTTILLWGFRPALILPL          527
GreA            LAAAPYRAPGQETEGFIIFYSPTFDLNGADASTKLFATHRALRDICVKMITLPPQFVVPI          549
AtrA            LAAAPYRAPGQETEGFVVFYAPTFDLQGDDASKKLSETHRAIKDVSVKMMTLPPQHIVPI          548
                           ..:     :                                  :.

GrsA            YFIQLDKMPLTSNGKIDRKQLPEPD---------------LT----FGMRVDYEAPRNEI          543
EAQ90367.1      RKESLPLLPTSTLGKISRAKMQSLFEAGVFSEDVALYGQALAAHILENQRDLSMESVTEA          619
EAU36089.1      DAHT---LVKSSLGKISRNKIKTGLESGAFQAFEETNNRLLK----LRQSTPVVPAGNET          575
EAU39346.1      RRED---MPKTTLGKLSRAKLQAALEAGQFAAYEAANEAAIR----RHRDTMRGEPASAE          597
EAQ91752.1      RAQD---MPKSTLGKLSRAKLRAGLESGAFKAQQEANDAAVK----RYRLATRSEPENDA          586
TdiA            RPQD---MPKSTLGKLSRAKLKTALEEGQFATQQQINDEAIR----RYQQKTRASPETPD          597
EAU31031.1      DRTM---LEKSTLGKLARGKIKAAYERGDYKSYQEANEQMMA----LHHKVSHHQPRSGL          585
EAU36966.1      EREA---LPKSSLGKLSRAKIKAAYEKGEYATYQNANNELMR----RYRESTRAEPQNDL          569
EAU36837.1      EQAL---LPKSTLA-----------------------------------TRASPKNDF          536
RalA            PKTD---FPKTSLGKIQRATLRKRLENGEFSETIAYIEKMTE----RQMG-GYTPAADAI          579
GreA            PVNQ---MEKTTLGKLSRARLISLFKQGQLAQHIARSEELLS----EARGATFVAPSTET          602
AtrA            PMDQ---MEKTTLGKLSRARLLSQFVQGALAKHVARAEELIS----MARGASFVTPSTDD          601
                       :  :: .
```

Fortsetzung Abbildung 6-48.

```
GrsA            EETLVTIWQDVLGI----EKIGIKDNFYALGGDSIKAIQVAARLHSYQL----KLETKDL          595
EAQ90367.1      EAGLIADFAQTLNI--DRHRIGPETRVFELGFTSMDLIRLKHRIDTRLGI---TMPVITL          674
EAU36089.1      ETLLLAAALHVFRV--TADEFGVETPMFAFGITSLDMIAWKRQAETILGH---EIPMLAI          630
EAU39346.1      EATILSIIREQLEIPE-ADDFGVTDSILSMGATSMDLVAIMQRVNRQ-LQLRKTLALTDM          655
EAQ91752.1      ETAILDIVRQQLELSA-EDDFGVNDSVLATGATSMDLVAIMHRMNKLPLLAAHPIKLTDL          645
TdiA            EAVILDIIKEQLEIRSDDDSFGVNDSILSIGATSMDLVAIIHRINKC-LQPSQPLRLTDI          656
EAU31031.1      EQSLLGVFTRTIPENL-TEDFDVLTSIFDLGITSIELLKLKRGIEDLIGHG--QIPLITL          642
EAU36966.1      EKTLLEVFTRSLSI-T-DDAFDVKTPIFDVGINSVELIRLKRDIEDHLGMAASAIPMIML          627
EAU36837.1      EKGLLEIFLRSFKI-S-EDEFDVQTPIFDVGIDSIELINLKRDIEQHLGFADATIPIIIL          594
RalA            ESAIIDLYADLFGI--AGATIGATTSFFDLGGTSLDIIKLQQRLHRQFGAQ-AGVSLAVI          636
GreA            EKALAKIYAGIFNL--AESEMSASDNFFELGGTSIDVIRLKREGEAHFGLP-EI-PTIQI          658
AtrA            EKALAAIYAGIFNL--QSNEVSARDNFFELGGTSIDVIRLKREGEAHFGLS-EI-PIIQI          657
                *  :       :        .     .   *  *:. :      .             :

GrsA            LKYPTIDQLVHYIKDSKRR-----SEQG----IVEGEIGLTPIQHWFFEQ------QFTN          640
EAQ90367.1      MKNPTARSLATALGLGGNS----ATATTEYDPVVTFKPSGSKTPLWLIHPGVGEVLVFVG          730
EAU36089.1      ITSPTIRVLARQLQDG-------HHGPGEYNPVVTLQPHGSKTPLWLIHPIGGEVLVFVS          683
EAU39346.1      LNYATARGLCQRIAATSG-----TGRKHVYDPVVVLQPHGRKTPLWLVHPGVGEVLVFVN          710
EAQ91752.1      LNNPTIRGLSVRIAKLTGALVETDKKPHEYDPVVTLQPNGTKTPLWLVHPGVGEVLVFVN          705
TdiA            LKDSTARGLAVALATGAAPRSQDQSSTHVYDPVVTLQPHGTKSPLWLVHPGVGEVLVFVN          716
EAU31031.1      MTNPTIRTLSDALKQHAQQ-----RDCSIYNPVVVLQSQGKKPPIWLVHPVGGEVMIFMN          697
EAU36966.1      MTHSTVRDLATALEKLQGP-----R-------------EYDPNPLWLVHPGAGEVLVFIN          669
EAU36837.1      LENTTTDLCM---------------------------------------------L---          605
RalA            LQNPSPRALAARID---PA----RRAHAEYDPVVPLQTSGSKTPLFCIHPGVGEVLVFVN          689
GreA            LKHPVVSSLANYVNALLSK----DSQTEEYDPIVPLQLTGNKTPIFFVHPGVGEVLIFVN          714
AtrA            LKNPIVSDLAKYVNGLVNN----DASANEYDPIVPLQLSGDKTPIFFVHPGVGEVLIFVN          713
                :

GrsA            MHHW----NQSYMLYRPNGFDKEIL--LRVFNKIVEHHDALRMIYKH--HNGKIVQINRG          692
EAQ90367.1      LAEHLADDDRPIYALRARGFEAG----QTRFGSIAEAVDTYVEAIRRRQPRGPYA-LAGY          785
EAU36089.1      LAGLFA-DDRPVHALRARGLNRG----EPPFGSIHEAADAYYQAIKRVQPHGPYA-VAGY          737
EAU39346.1      LAHH-I-TDRPVYAFRAKGFNAAEG--ETPFTSLEEVFETYKAAMKARQPQGPYA-IAGY          765
EAQ91752.1      LAHR-I-RDRPVYAFRAKGFNAAEG--ETPFKTLDEVFHTYRDSIKKRQPQGPYA-IAGY          760
TdiA            LAHH-I-TDRPVYAFRAKGFNAAAGLPETPFTSLEELFTTYRDAIKERQPHGPYA-IAGY          773
EAU31031.1      LAKF-I-IDRPVYGLRARGFNDG----EDPFHTFEEIVSTYHASIKEKQPSGPYA-IAGY          750
EAU36966.1      LAQY-I-VDRPVYALRARGFNDG----EQPFETIEEATASYYNGIRSRQPHGPYA-LAGY          722
EAU36837.1      --------------YVPAASMKG----EKPFDSIEDAVTSYYNGVKSKQPHGPYA-LAGY          646
RalA            LANYFV-NDRPFYALRARGFNPG----ETHFQSFDELVRTYVTAIRKRQPQGPYA-IVGY          743
GreA            LAKYFQ-NERPFYALRARGFEPG----HPFFTSMDEMVSCYAAAVKRTQATGPYA-IAGY          768
AtrA            LAKYFQ-NERPFYAFRARGFEPG----HPFFGSMDEMVTSYANAMKKTQPKGPYA-IAGY          767
                                  .          * .: :         :     *  . :

GrsA            LEGTLFDFYTFDLTANDNEQQVICEESARLQNSINLEVGPLVKIALFHTQNGDHLFMAIH          752
EAQ90367.1      SYGTMLA---FEVAKRLDTLEGGVGSAVGFLGSFNLP--PHIK-----------------          823
EAU36089.1      SYGSLVA---FEVAKRLDQHG---KDEVPFFGSLDLP--PFHA-----------------          772
EAU39346.1      SFGGMVA---FEIAKRLEAEG----DEVRYCGSWNLP--PHIK-----------------          799
EAQ91752.1      SFGGMVA---FEIGKLLEAEG----DEVAYCGSWNLP--PHIK-----------------          794
TdiA            SFGGMVA---FEVSKLLEQDG----DEVRYCGSWNLP--PHIK-----------------          807
EAU31031.1      SYGAKVA---FDIAKALEHNG----DEVRFLGLLDLP--PSLN-----------------          784
EAU36966.1      CYGSMLA---FEVAKMLESHG----EEVRFLGSFNLP--PHIK-----------------          756
EAU36837.1      CYGSMLA---FEVAKKLEENG----DEVRFVGSFNLP--PHIK-----------------          680
RalA            SYGGPVA---LPVAQMLEAQG----EQVAFLGSIDAP--PVIK-----------------          777
GreA            SYGGVVA---FEVAKRLEAMG----DEVKFTGLINIP--PHIA-----------------          802
AtrA            SYGGVVA---FEVAKRLESMG----EEVKFVGLINIP--PHIA-----------------          801
                  *  .    : :    :       . .      :    *

GrsA            HLVVDGISWRILFEDLATAYEQAMHQQTIALPEKTD----------SFKD--W-SIELEK          799
EAQ90367.1      -ARMRQLSWNMCLLHLTQFLGLTTEAFVEGIHDEGEAGTYRGAARGAALETVLGAADGSR          882
EAU36089.1      -QIISKSDWTESLLHLASSLSLIAEEEINTLGADLR-GL--P--QPRAIQKILARAPPRR          826
EAU39346.1      -WRMKQLLWDECIIHLFYFVDLMDEETAYTHKPKLC-ELERQGRRLEAVRYLRQHSNPAR          857
EAQ91752.1      -FRMRELLWDECVIHLFYFVGLMDEATAYTHKTQLC-EFNKQGRRLDAIRYLRQHSDAAR          852
TdiA            -FRMRELVWEECVIHLFYFVGLMTELAAYTHKPTLQ-EFNRANRRLDAIRYLRQHCDAAR          865
EAU31031.1      GTQMRAVAWKEMLLHICRMVGVIREEGIKKIYPRLE-PENIS--PRHAIETVMGEADVTR          841
EAU36966.1      -MRMRELDWKECLLHLAYFLDLVSQERSREMSV--E-LAGLS--HDEILDSVIQNANMER          810
EAU36837.1      -MRMRELDWKECLLHLAYFLDLITQKRSRELAV--E-LDGLD--QDTILQAIIDEADKER          734
RalA            -HPRGKVDAVESALMLAFFLSLIDRSQIDALPERLRAI----QPHKDPCDYLFEIAPKER          832
GreA            -DRMHEIDWTGGMLNLSYFLGLVSKHDANDLAPALRPM----TR-NEQLEVVWKLSPPER          856
AtrA            -DRMHEIDWTGGMLNLAYFLSLVTKQDATDLHPKLKTM----TK-EEQLEVVWKLAPPER          855
                               :        .                                :

GrsA            YANSELFLEEAEYWHHLNYYTENVQIKKDYVTMNNKQKNIRYVGMELTIEETEKLLKNVN          859
EAQ90367.1      LAELGLERAALARWADVAF--GLQSMAADYDPDGQVAGIDVFHAVPLKVAA------ASR          934
EAU36089.1      IRELDLSPDGLMRWTKLTS--AMAQATRGYVPVGQTRSVDVFYTEPSGALA------TTR          878
EAU39346.1      WDELGLSEEYYLLWVNLAS--NMQGMATEYEPSGNVKHLDVFVADPLTHVA------RTR          909
EAQ91752.1      WDELGLSEEYYLLWVGLAS--NMQGLAVDYEPSGNVNSMDIFVADPLSHVA------KDR          904
TdiA            WDELGLSEEYYLLWVGLAS--NMQSLAVDYEPSGSVKCMDVFVADPLSHVA------KDR          917
EAU31031.1      LAELGLTASALERWANLTH--ALQRCIVDHKTNGSVAGADAFYCDPMASMA------ISN          893
EAU36966.1      YAELSLNRPLLVRWADVAY--ELHRMAFDYDPAGCVAGMDVFFSIPLAIAA------ASK          862
EAU36837.1      YAQLSLSRPFLSRWADVAY--ELHRIAGDYDPDGRVASMDVFFSIPLAIAA------ASK          786
RalA            LKELDLDLPRFKAWAALAL--SLSDIGQAYTPSGSVDSITVFYADPLW---------GSK          881
GreA            LVELQLTPGKLDHWVDIAG--SLIECGKDYNPSGSVSAVDVFYAIPLR---------GSK          905
AtrA            VTELQLTPGKLDHWVSIAG--SLIECGKSYNPGGNVSAVDVFYAIPLK---------GSK          904
                  :  *       *  :            :           :                 .
```

Fortsetzung Abbildung 6-48.

```
GrsA            KAYRTEINDILLTALGFALKEWADIDKIVINLEGHGREEILEQMNIARTVGWFTSQYPVV          919
EAQ90367.1      -----------EEWVGEHLSKWRDFARSEPRL----------------------------          955
EAU36089.1      -----------DEWLDRH-REWRQFGRLETQF----------------------------          898
EAU39346.1      -----------EEWVNGLLAAWKDFVREGVRY----------------------------          930
EAQ91752.1      -----------KDWIETRLSAWKDFVRTEVRF----------------------------          925
TdiA            -----------IDWVEGRLSAWKEFVREDVRF----------------------------          938
EAU31031.1      -----------EQWACDYIGKWSDHTRSPPRF----------------------------          914
EAU36966.1      -----------TEWRNVHLSQWEDFTRTVPKF----------------------------          883
EAU36837.1      -----------SEWRNVHLSQWDDFTRSHVRF----------------------------          807
RalA            -----------QAYLKHELKRWDQLTRSPNRY----------------------------          902
GreA            -----------ADWLNNQLKPWSGFSRGDASY----------------------------          926
AtrA            -----------EDWLNKQLKPWSQFSRGEPQF----------------------------          925
                                     *    :

GrsA            LDMQKSDDLSYQIKLMKENLRRIPNKGIGYEIFKYLTTEYLRPVLPFTLKPEINFNYLGQ          979
EAQ90367.1      ----------------------HAVGGAHYTMI--------------------GPAHVVG          973
EAU36089.1      ----------------------HPLEGLHYRLM--------------------DEDNVHK          916
EAU39346.1      ----------------------HHVEGAHYTML--------------------KPEYVAN          948
EAQ91752.1      ----------------------HDVQGAHYTML--------------------NPEYVAN          943
TdiA            ----------------------HDVQGAHYTML--------------------NREYVEA          956
EAU31031.1      ----------------------HHIAGTHYTIL--------------------DAENIFS          932
EAU36966.1      ----------------------HDVAGEHYSMI--------------------GPDHVFS          901
EAU36837.1      ----------------------HDVPGEHYSMI--------------------GPEHVFA          825
RalA            ----------------------IEVAGEHHTML--------------------DPRHVAS          920
GreA            ----------------------TDVPGQHYTLM--------------------DFDHVPQ          944
AtrA            ----------------------IDVPGQHYTLM--------------------DFDHVPQ          943
                                          *  : ::                       :

GrsA            FDTDVKTELFTRSPYSMGNSLGPDGKNNLSPEGESYFVLNINGFIEEGKLHITFSYNEQQ         1039
EAQ90367.1      FAAKLKGALAARGV---------------------------------------------          987
EAU36089.1      VYRVLSRAMDARGTLCLSLSL--------------------------------------          937
EAU39346.1      FAKTLRTVLRERGV---------------------------------------------          962
EAQ91752.1      FAETLRRVLRERGL---------------------------------------------          957
TdiA            FAGTLKNVLRERGL---------------------------------------------          970
EAU31031.1      FQKTFLRALNDRGI---------------------------------------------          946
EAU36966.1      FQKTLRKALDERGM---------------------------------------------          915
EAU36837.1      FQKILRSALAERGM---------------------------------------------          839
RalA            FQAVLRAELDRVLGDAA------------------------------------------          937
GreA            FQKIFRGRLEARGL---------------------------------------------          958
AtrA            FQKIFRGRLEARGL---------------------------------------------          957
                .   .   :

GrsA            YKEDTIQQLSRSYKQHLLAIIEHCVQKEDTELTPSDFSFKELELEEMDDIFDLLADSLT          1098
EAQ90367.1      ------------------------------------------------------------          987
EAU36089.1      ------------------------------------------------------------          937
EAU39346.1      ------------------------------------------------------------          962
EAQ91752.1      ------------------------------------------------------------          957
TdiA            ------------------------------------------------------------          970
EAU31031.1      ------------------------------------------------------------          946
EAU36966.1      ------------------------------------------------------------          915
EAU36837.1      ------------------------------------------------------------          839
RalA            ------------------------------------------------------------          937
GreA            ------------------------------------------------------------          958
AtrA            ------------------------------------------------------------          957
```

Fortsetzung Abbildung 6-48.

6.7. Multiproteinsequenzvergleich von FtmPT1 mit bekannten PTasen

```
FtmPT1      -----------------------MPPAP----------------PDQKPCHQLQPAPYRA   21
FtmPT2      ---------------------------M----------------TIPTEISCPEEDAFQL   17
FgaPT1      --------------------MT--KTDAQ---GRHPQETATHAATTDEEVQDQWRAPFEV   35
FgaPT2      ----------------------------------------------MKAANASSAEAYRV   14
7-DMATS     MSIGAEIDSLVPAPQGLNGTAAGYPAKTQ-------KELSNGDFDAHDGLSLAQLTPYDV   53
AnaPT       ----------------------MSPLSMQ---TDSVQGTAENKSLETNGTSNDQQLPWKV   35
CdpC3PT     --------------------MT-------------VSSTAV--EASAPCAEMGHDIPYRT   25
CdpNPT      ----------------MDGEMTASPPDISACDTSAVDEQTG--QSGQSQAPIPKDIAYHT   42
MaPT        ---------------------------M----------------STTESLTASHQAVYKT   17
                                                                     :

FtmPT1      LSESILFGS--VDEERWWHSTAPILSRLLISSNYDVDVQYKYLSLYRHLVLPALGPYPQR   79
FtmPT2      LDKFSWFPS--DDQRRWWEYTGPYLLKLLRDAKYPQKDQVPCLYLLQQLLVPYLGTFPVV   75
FgaPT1      LSRTLVFQH--EDHRLWWERAASKLATYLRLAKYSVGSQYQHLLMFYSVYAPNLGPWPND   93
FgaPT2      LSRAFRFDN--EDQKLWWHSTAPMFAKMLETANYTTPCQYQYLITYKECVIPSLGCYPTN   72
7-DMATS     LTAALPLPAPASSTGFWWRETGPVMSKLLAKANYPLYTHYKYLMLYHTHILPLLGPRPPL   113
AnaPT       LGKSLGLPT--IEQEQYWLNTAPYFNNLLIQCGYDVHQQYQYLAFYHRHVLPVLGPFIRS   93
CdpC3PT     LSRSMIFAN--LDQYQYWHQIGPVLGKMLVDGEYSIHRQYEYLSLFAHLIIPKLGPFPSP   83
CdpNPT      LTKALLFPD--IDQYQHWHHVAPMLAKMLVDGKYSIHQQYEYLCLFAQLVAPVLGPYPSP   100
MaPT        LSDVFEFSN--DDQKLWWHSTAPMFAEMLQSANYDAHAQYRHLAIYKKHVIPFLGVYPTN   75
            *     :     .    *   .  :   *    *    :   *        * **

FtmPT1      DPE--TGIIATQWRSGMVLTGLPIEFSNNVA-----RALIRIGVDPVTADSGTAQDPFNT   132
FtmPT2      G------QAPLPWWSNVTTYGVPFELSWNLL-----HNIVRIGFEPLSHLAESGVDAFNK   124
FgaPT1      KR------DNVHWVCGICPGGENLEISMNYQQ--GAKCTVRIAAETITPAAGTDKDPFNL   145
FgaPT2      S--------APRWLSILTRYGTPFELSLNCS-----NSIVRYTFEPINQHTGTDKDPFNT   119
7-DMATS     ENSTHPSPSNAPWRSFLTDDFTPLEPSWNVNGNSEAQSTIRLGIEPIGFEAGAAADPFNQ   173
AnaPT       S-------AEANYISGFSAEGYPMELSVNYQ---ASKATVRLGCEPVGEFAGTSQDPMNQ   143
CdpC3PT     G--------RDIYRCLLGNIGGPFELSQNFQ---RLGSTARLAFEPTSYLASTSADPFNR   132
CdpNPT      G--------RDVYRCTLGGN-MTVELSQNFQ---RSGSTTRIAFEPVRYQASVGHDRFNR   148
MaPT        D--------RDRWLSILTCYGTPFELSLNCN-----DSVVRYTFEPINAATGTEADPFNT   122
                           : . .      .* * *           *   :     :    * :*

FtmPT1      TRPKVYLETAARLL-PGVDLTRFYEFETELVITKAEEAVLQAN---PDLFRSPWKSQILT   188
FtmPT2      TAPEECVSRLACLD-NTIDLARFRHFQHHLLVTPEEETWLLKE---KAPLAKSGRGQQTL   180
FgaPT1      TAEKKMIEDLKALQ-PNLNFTWFNHFQREVLVPEEV-A-LNND---EIISKVPFKNQRLH   199
FgaPT2      HAIWESLQHLLPLE-KSIDLEWFRHFKHDLTLNSEESAFLAHN---DRLVGGTIRTQNKL   175
7-DMATS     AAVTQFMHSYEATE-VGATLTLFEHFRNDMFVGPETYAA-----LRAKIPEGEHTTQSFL   227
AnaPT       FMTREVLGRLSRLD-PTFDLRLFDYFDSQFSLTTSEANLA------ASKLIKQRRQSKVI   196
CdpC3PT     HAVHATLAELRMTGSATVDLELHHALAADLTLTDRNEQLL-----TAELAKTNWKSQILL   187
CdpNPT      TSVNAFFSQLQLLV-KSVNIELHHLLSEHLTLTAKDERNLNEEQLTKYLTNFQVKTQYVV   207
MaPT        HAIWESLQRLKAVQ-PAISLDYFNHFKRDLTINSQEAAYLHE----NNLAEGQIWTQNKL   177
                  .            :  .  :  .. :                       .

FtmPT1      AMDLQKSGTVLVKAYFYPQPKSAVTGRSTEDLLVNAIRKVDREGR-FETQLA--NLQRYI   245
FtmPT2      AVEFQ-NGGISAKAYFFPGMKSLATGLSPGKLILDSIERLALPGL--KEPVH--HLRSTL   235
FgaPT1      GLDLS-EGAFMLKSYFMPAIRSAITGVENTQIMFESIRKLNLKNANFISALS--TLEDWM   256
FgaPT2      ALDLK-DGRFALKTYIYPALKAVVTGKTIHELVFGSVRRLAVREPRILPPLN--MLEEYI   232
7-DMATS     AFDLD-AGRVTTKAYFFPILMSLKTGQSTTKVVSDSILHLALKSG--VWGVQTIAAMSVM   284
AnaPT       AFDLK-DGAIIPKAYFFLKGKSLASGIPVQDVAFNAIESIAPKQI--ESPLR--VLRTFV   251
CdpC3PT     ALDLN-KTGITVKEYFYPALKAAATGHSVAELCFSAIRKVDVQG-----RLA--APCKAI   239
CdpNPT      ALDLR-KTGIVAKEYFFPGIKCAATGQTGSNACFGAIRAVDKDG-----HLD--SLCQLI   259
MaPT        ALDLK-GGEFMVKAYIYPALKAIATGKSIQELMFSSVRDLTKGQANISSSLG--MLEDYL   234
            ..::     .  * *:     .  :*    .    ::  :          :        :

FtmPT1      ERRRRGLHVPGVTADKPPATAADKAFDACSFFPHFLSTDLVEPGKSRVKFYASERHVNLQ   305
FtmPT2      GLQDDGH---------P---------TDTAIAPFLLGVDLCTPERSRLKFYVTDQVVSWD   277
FgaPT1      VPTNG----------------------RFMEYWDGISYDAVDACKARIKIYTGIRMKSIE   294
FgaPT2      ----RSR---------G---------SKSTASPRLVSCDLTSPAKSRIKIYLLEQMVSLE   270
7-DMATS     EAWIG--------------------SYGGAAKTEMISVDCVNEADSRIKIYVRMPHTSLR   324
AnaPT       TKLFS--------------------KPTVTSDVFILAVDCIVPEKSRIKLYVADSQLSLA   291
CdpC3PT     EAHMQ--------------------RQ-TQTDIHFLSVDLVEPGTTRFKLYLMELEVTLA   278
CdpNPT      EAHFQ--------------------QS--KIDDAFLCCDLVDPAHTRFKVYIADPLVTLA   297
MaPT        ----ECR---------G---------PESTACPRLLSCDLISSHKSRIKIYISEDMVSFP   272
                                             :  *      :*.*.*      .
```

Abbildung 6-49: Multiproteinsequenzvergleich von FtmPT1 mit ausgewählten Prenyltransferasen (Clustal Omega 1.2.1). Markiert sind Aminosäuren in FtmPT1, die an der Stabilisierung des Diphosphates (weiß auf scharzem Untergrund) beteiligt sind, die beteiligten Tyrosine (auf grauem Untergrund) und G115 (fette Buchstaben). R292 in FtmPT1 ist in allen Sequenzen konserviert, spielt aber aufgrund seiner zu großen Entfernung zu den Substraten keine Rolle in der Reaktion von FtmPT1. FgaPT1 (XP_756136), FgaPT2 (AAX08549.1), FtmPT1 (AAX56314.1), FtmPT2 (ACF22981.1), 7-DMATS (ABS89001.1) und CdpNPT (ABR14712.1) sind aus *A. fumigatus*, AnaPT (EAW16181.1) und CdpC3PT (EAW17508.1) sind aus *N. fischeri*. MaPT (ABZ80611.1) ist aus *M. aurantiaca*.

```
FtmPT1       MVEDIWTFGGLRRDP-DALRGLELLRHFWADIQMREGYYTMPRGFCELGKSSAG-FEAPM   363
FtmPT2       RVADMWTLRGKRLEDPQCADGLALLRKLWDLLAIPEGYRSNIRPDFAFGTPPPEDYRPVM   337
FgaPT1       HARDVWTLGGRLQGE-DIEKGFDLVARLWRRLMDEEPSTCE--------------MKYWM   339
FgaPT2       AMEDLWTLGGRRRDA-STLEGLSLVRELWDLIQLSPGLKSYPAPYLPLGVIPDER--LPL   327
7-DMATS      KVKEAYCLGGRLTDE-NTKEGLKLLDELWRTVFGIDDEDAE-----L---PQNSHRTAGT   375
AnaPT        TLREFWTLGGSVTDS-ATMKGLEIAEELWRILQYDDAVCSH-----------SNMDQLPL   339
CdpC3PT      KLEEHWTLGGTLTDK-ETMRGLQMIRELWVDLEIVDGKRAEPQRPSL---PGDPLSIVPF   334
CdpNPT       RAEEHWTLGGRLTDE-DAAVGLEIIRGLWSELGIIQGPLEPSA--------MMEKGLLPI   348
MaPT         AMQDLWTLGGRRNDD-STLAGLELIQELWDLLQIPPGLRSYPEGYLPLGARPTEL--LPS   329
                : : : *          *: :   :*  :

FtmPT1       MFHFHLDGSQSPFPDPQMYVCVFGMN--SRKLVEGLTTFYRRVGWEEMASHYQANFLANY   421
FtmPT2       MANWTLS-PKKKFPDPQIYLLTVGMN--DAVVMDALVAFYEVLGWTDLASTYKDKVASYF   394
FgaPT1       QWVWELR-TDVPFPVPKLYFSVAAAE--DHYVSDTVVEILDYLGWDDLVQTHRALMDEAW   396
FgaPT2       MANFTLH-QNDPVPEPQVYFTTFGMN--DMAVADALTTFFERRGWSEMARTYETTLKSYY   384
7-DMATS      IFNFELR-PGKWFPEPKVYLPVRHYCESDMQIASRLQTFFGRLGWHNMEKDYCKHLEDLF   434
AnaPT        VVNYELS-SGSATPKPQLYLPLHGRN--DEAMANALTKFWDYLGWKGLAAQYKKDLYANN   396
CdpC3PT      FMNYEIT-PGQPLPKPKFYFPLIGIP--ELKIANVLAAFFERHGMHDLARVYPENLQSYY   391
CdpNPT       MLNYEMK-AGQRLPKPKLYMPLTGIP--ETKIARIMTAFFQRHDMPEQAEVFMENLQAYY   405
MaPT         MANFTLL-PDHPVPEPQVYFTVFGMN--DMAVADALTRFFERHGWTDMAREYKRSLKAYY   386
                : :       * *:.*.        .  :   :  :            .   .

FtmPT1       PDEDFEKAAHLCAYVSFAYKN-GGAYVTLYNHSFNPV----GDVSFPN------------   464
FtmPT2       PGPDFTKTNYIHSGVSFSYRH-SKPYLSVYYSPF--------------------------   427
FgaPT1       SLGQTTKSYLAFSYISVTFHSIKGPYITTYGNPSGPRPVF--------------------   436
FgaPT2       PHADHDKLNYLHAYISFSYRD-RTPYLSVYLQSFETGDWAVANLSESKVKCQDAACQPTA   443
7-DMATS      PHHPLSSSTGTHTFLSFSYKKQKGVYMTMYYNLRVY---ST-------------------   472
AnaPT        PCRNLAETTTVQRWVAFSYTESGGAYLTVYFHAVGG---MKGNL----------------   437
CdpC3PT      PGEDLAIATDRQAWLSISYTEEKGPYLTMYYH----------------------------   423
CdpNPT       EGKNLEEATRYQAWLSFAYTKEKGPYLSIYYFWPE-------------------------   440
MaPT         PDENYETMNYVHAYISFSYRK-NKPYLGVYLQSFETGSWSTGELSYIRSF----------   435
                             ::.::      *:  *

FtmPT1       ----------------   464
FtmPT2       ----------------   427
FgaPT1       ----------------   436
FgaPT2       LPPDLSKTGVYYSGLH   459
7-DMATS      ----------------   472
AnaPT        ----------------   437
CdpC3PT      ----------------   423
CdpNPT       ----------------   440
MaPT         ----------------   435
```

Fortsetzung Abbildung 6-49.

6.8. MS- und NMR-Spektren des enzymatischen Produktes von FtmPT1_G115T mit Brevianamid F

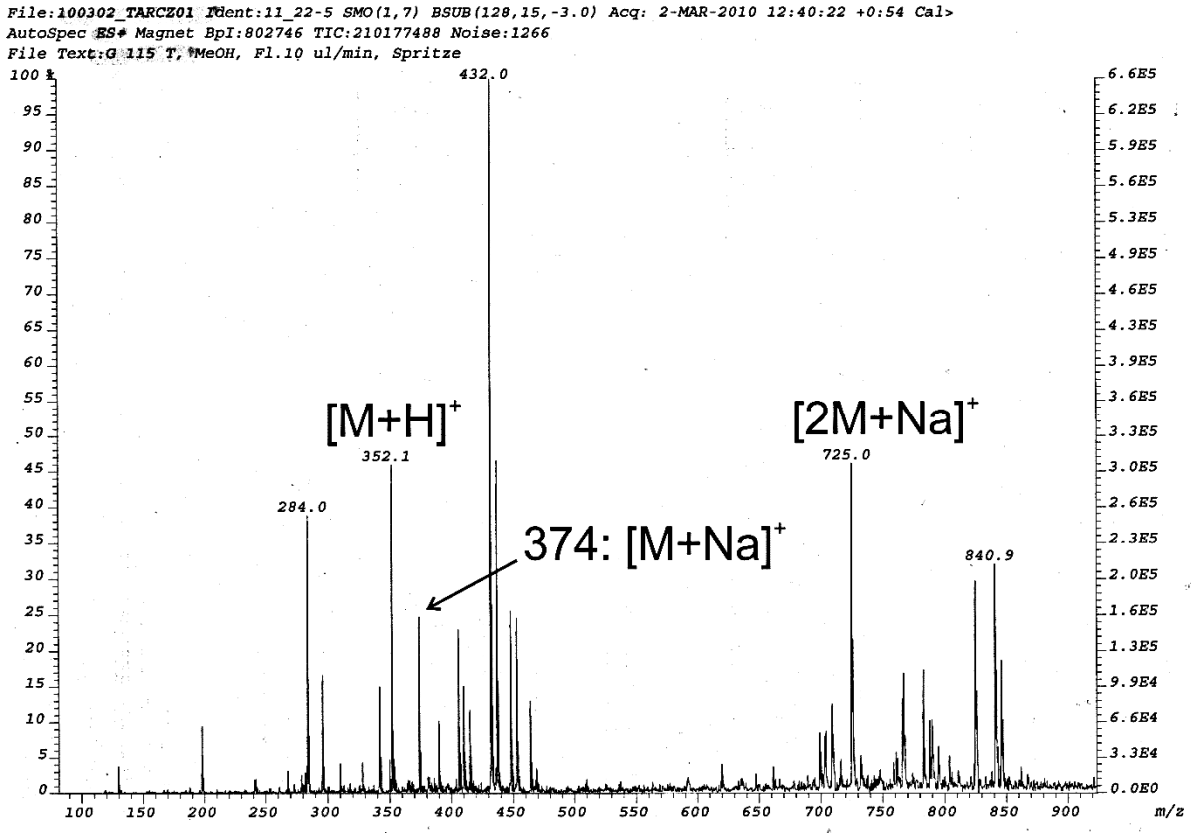


Abbildung 6-50: Positives ESI-MS-Spektrum von *cyclo*-(2*S*,3*R*)-3-Dimethylallyl-L-Trp-L-Pro ($C_{21}H_{25}N_3O_2$). Theoretische Masse $[M+H]^+$: 352,19.

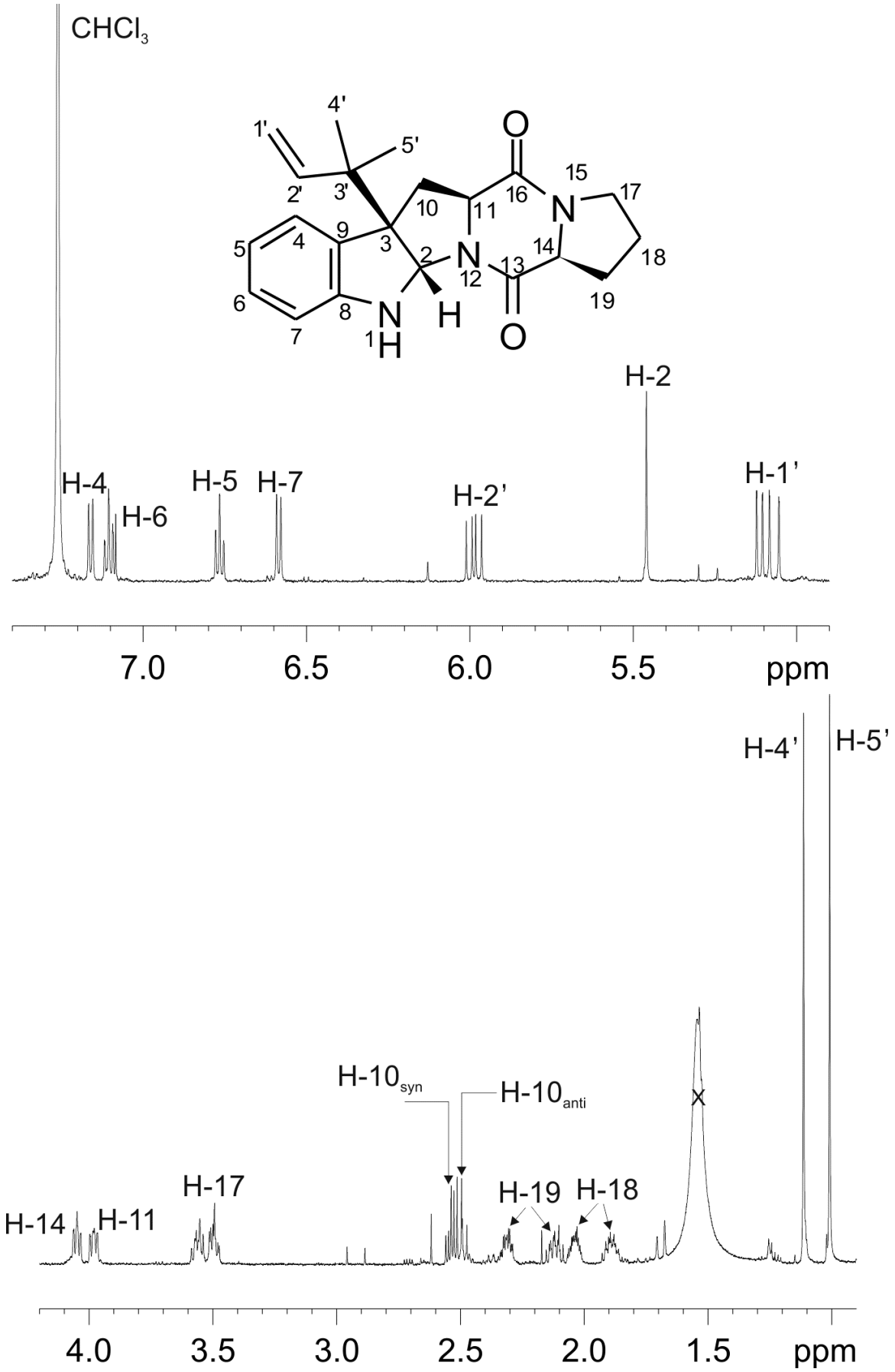


Abbildung 6-51: ^{1}H-NMR-Spektrum von *cyclo*-(2*S*,3*R*)-3-Dimethylallyl- L-Trp-L-Pro, gemessen in $CDCl_3$ (600 MHz).

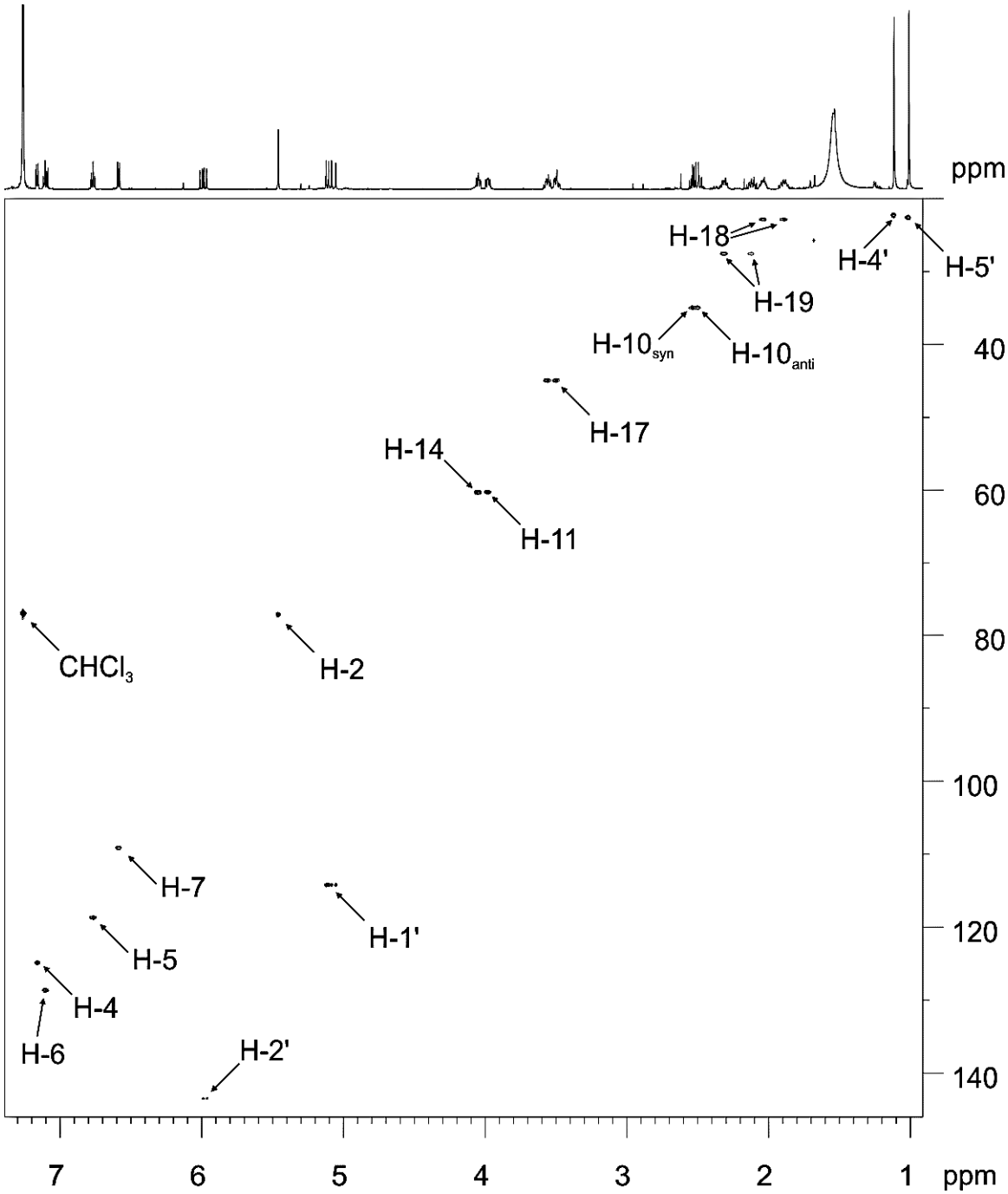


Abbildung 6-52: $^{1}H/^{13}C$-HSQC-Spektrum von *cyclo*-(2*S*,3*R*)-3-Dimethylallyl-L-Trp-L-Pro, gemessen in $CDCl_3$ (600 MHz).

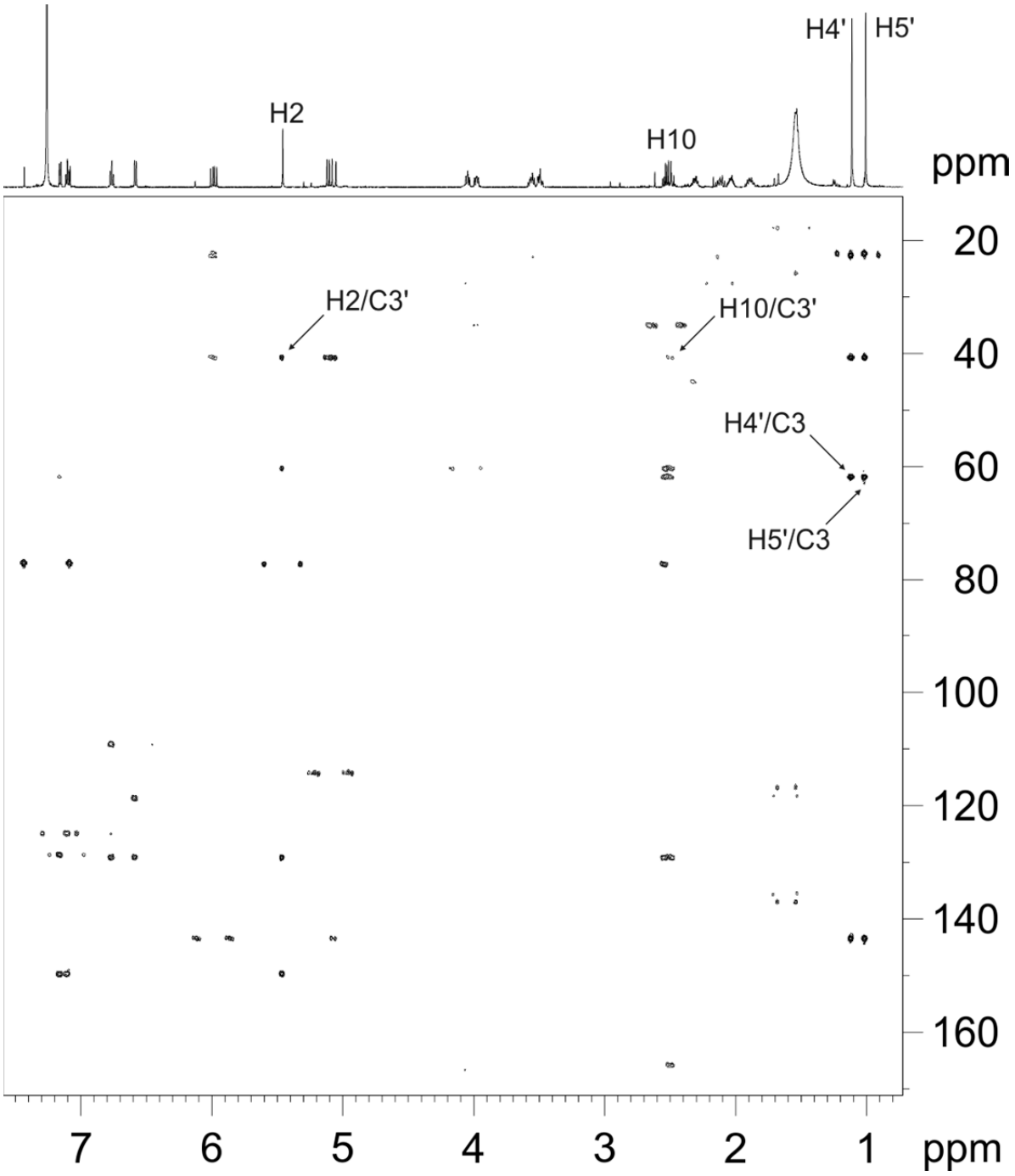


Abbildung 6-53: $^{1}H/^{13}C$-HMBC-Spektrum von *cyclo*-(2*S*,3*R*)-3-Dimethylallyl-L-Trp-L-Pro, gemessen in $CDCl_3$ (600 MHz). Pfeile kennzeichnen die für die Strukturaufklärung relevanten Korrelationen zwischen Kernen des Dipeptids und des Prenylrests.

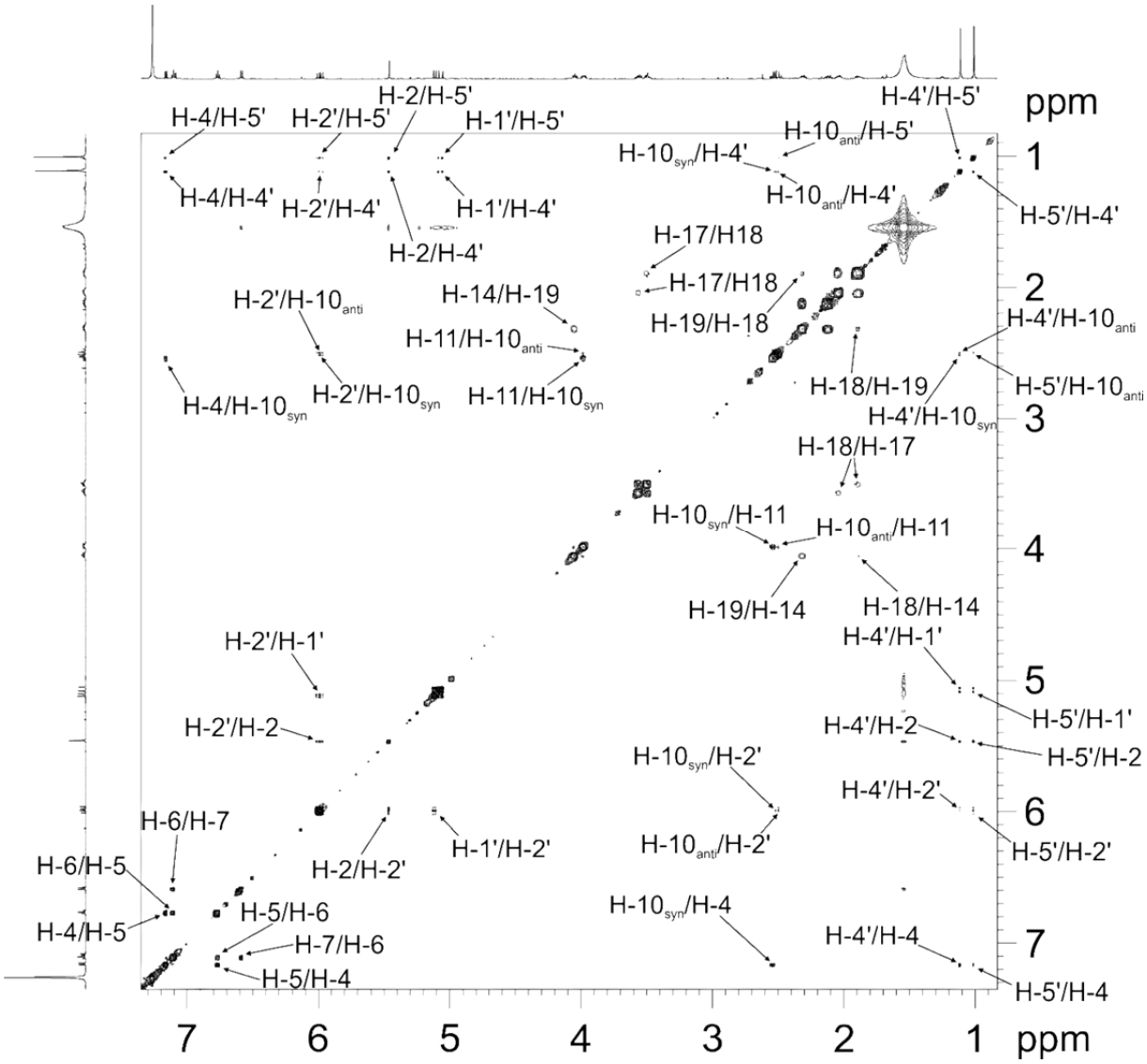


Abbildung 6-54: ^{1}H/^{1}H-NOESY-Spektrum von *cyclo*-(2*S*,3*R*)-3-Dimethylallyl-L-Trp-L-Pro, gemessen in $CDCl_3$ (600 MHz).

6.9. NMR-Spektren der enzymatischen Produkte von FtmPT1_G115T mit cyclischen Dipeptiden

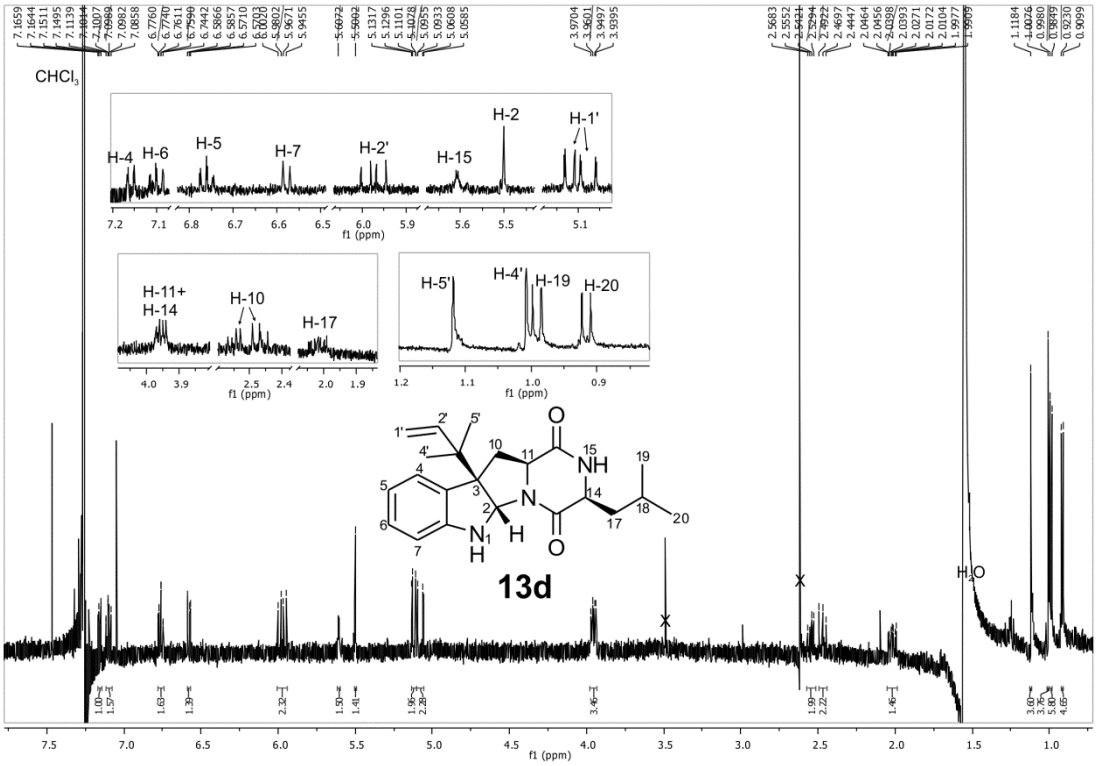


Abbildung 6-55: ^{1}H-NMR-Spektrum von *cyclo*-3-Dimethylallyl-L-Leu-L-Trp (13d), gemessen in $CDCl_3$ (500 MHz). Das Signal von H-18 und das zweite H-17-Signal sind vom Wassersignal überlagert.

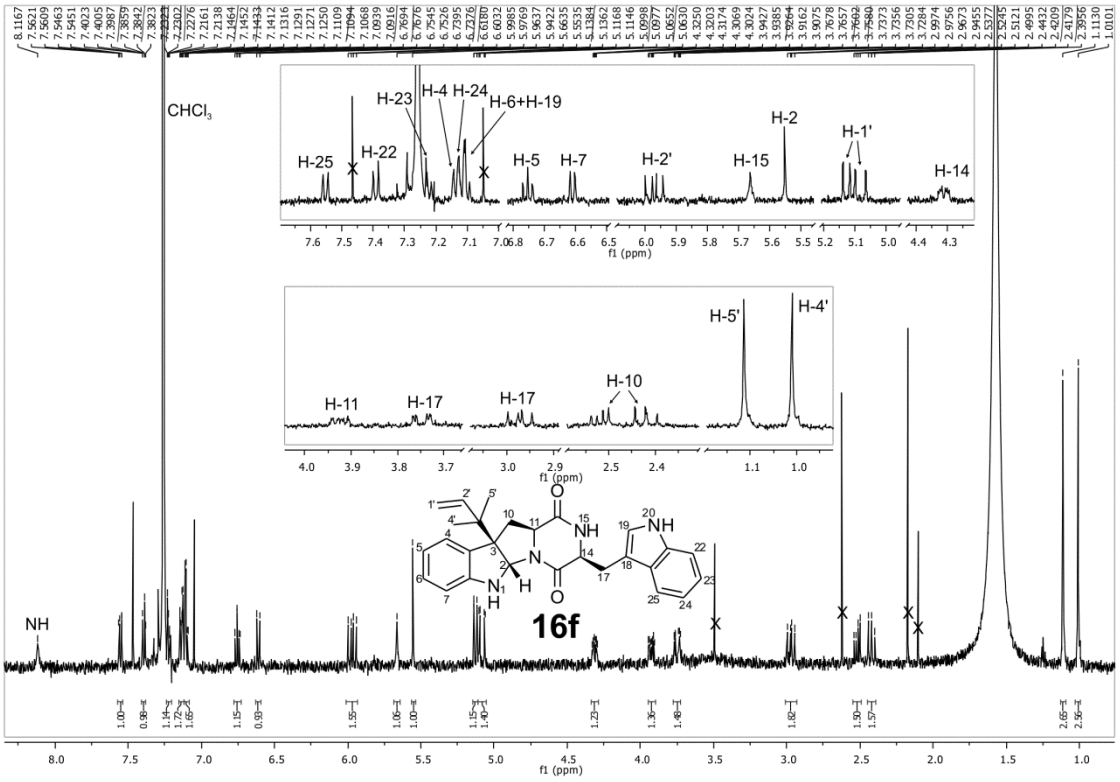


Abbildung 6-56: ^{1}H-NMR-Spektrum von *cyclo*-3-Dimethylallyl-L-Trp-L-Trp (16f), gemessen in $CDCl_3$ (500 MHz).

6.10. MS- und NMR-Spektren von 8-Amino-2-naphthol und der enzymatischen Produkte von FtmPT1_Y205F

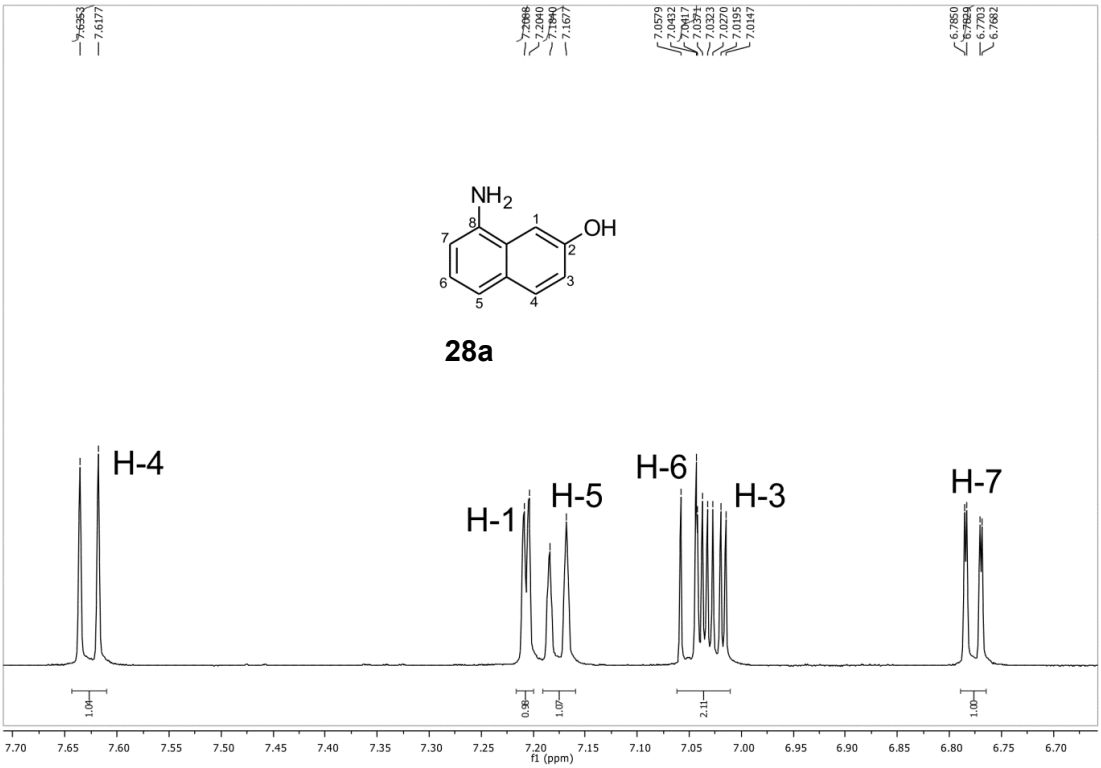


Abbildung 6-57: ^{1}H-NMR-Spektrum von 8-Amino-2-naphthol (28a), gemessen in CD_3OD (500 MHz).

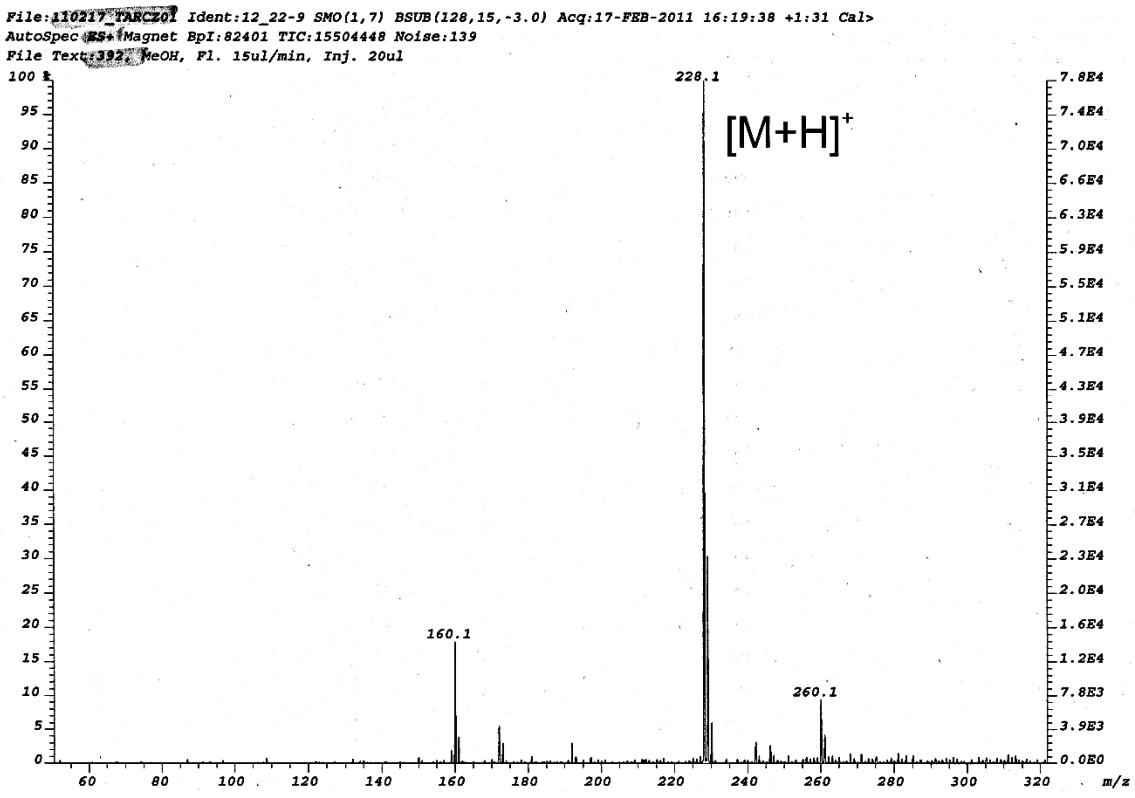


Abbildung 6-58: Positives ESI-MS-Spektrum von 7-Dimethylallyl-8-Amino-2-naphthol (28b) ($C_{15}H_{17}NO$). Theoretische Masse $[M+H]^+$: 228,14.

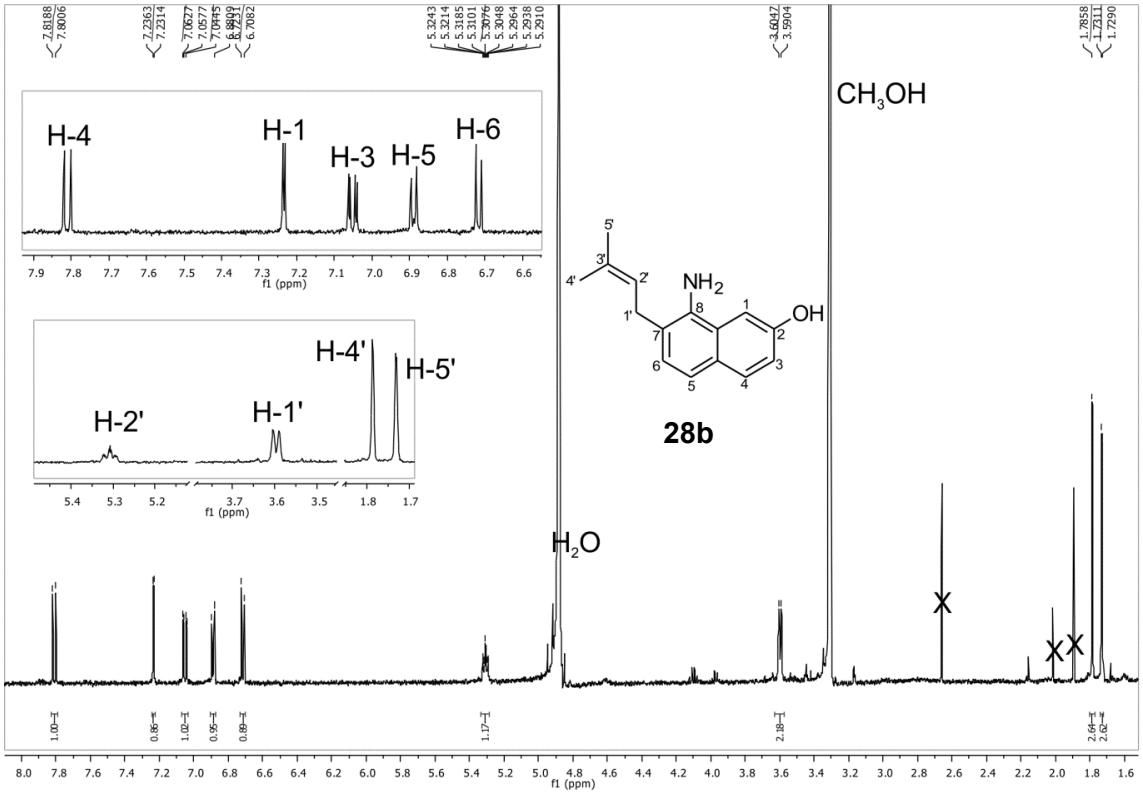


Abbildung 6-59: ^{1}H-NMR-Spektrum von 7-Dimethylallyl-8-Amino-2-naphthol (28b), gemessen in CD_3OD (500 MHz).

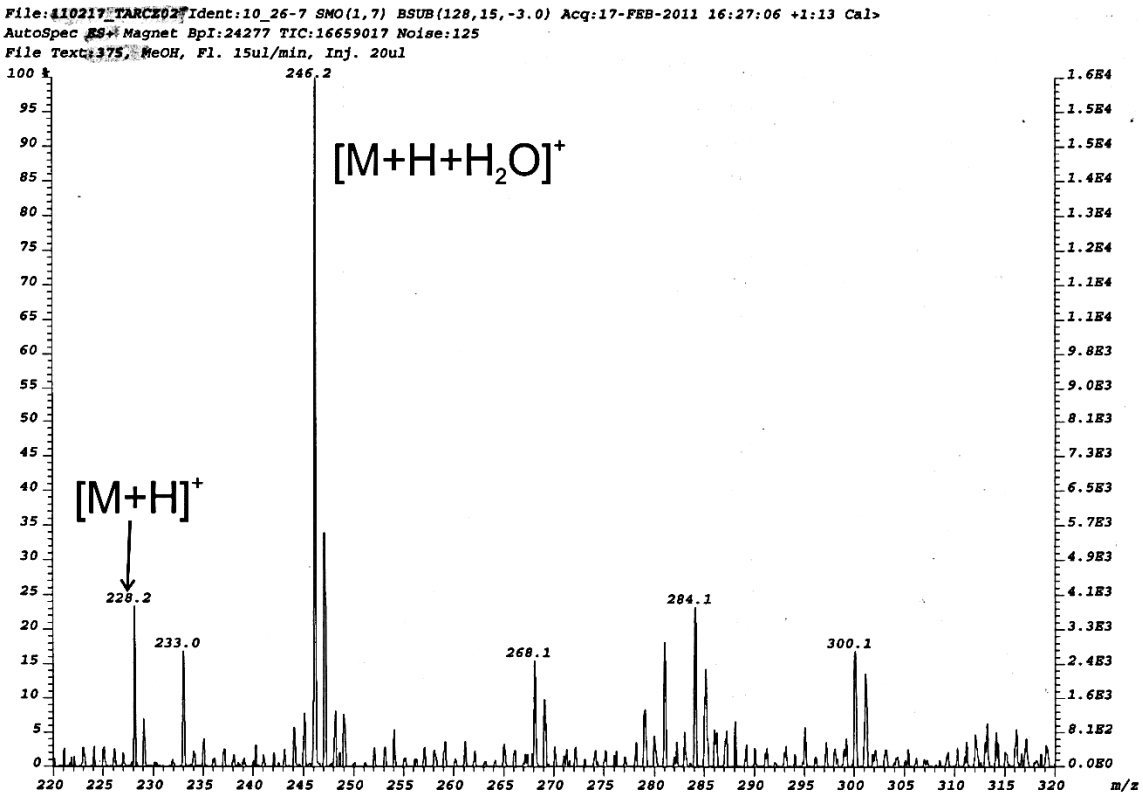


Abbildung 6-60: Positives ESI-MS-Spektrum des Umlagerungsproduktes (28c) ($C_{15}H_{17}NO$). Theoretische Masse $[M+H]^+$: 228,14.

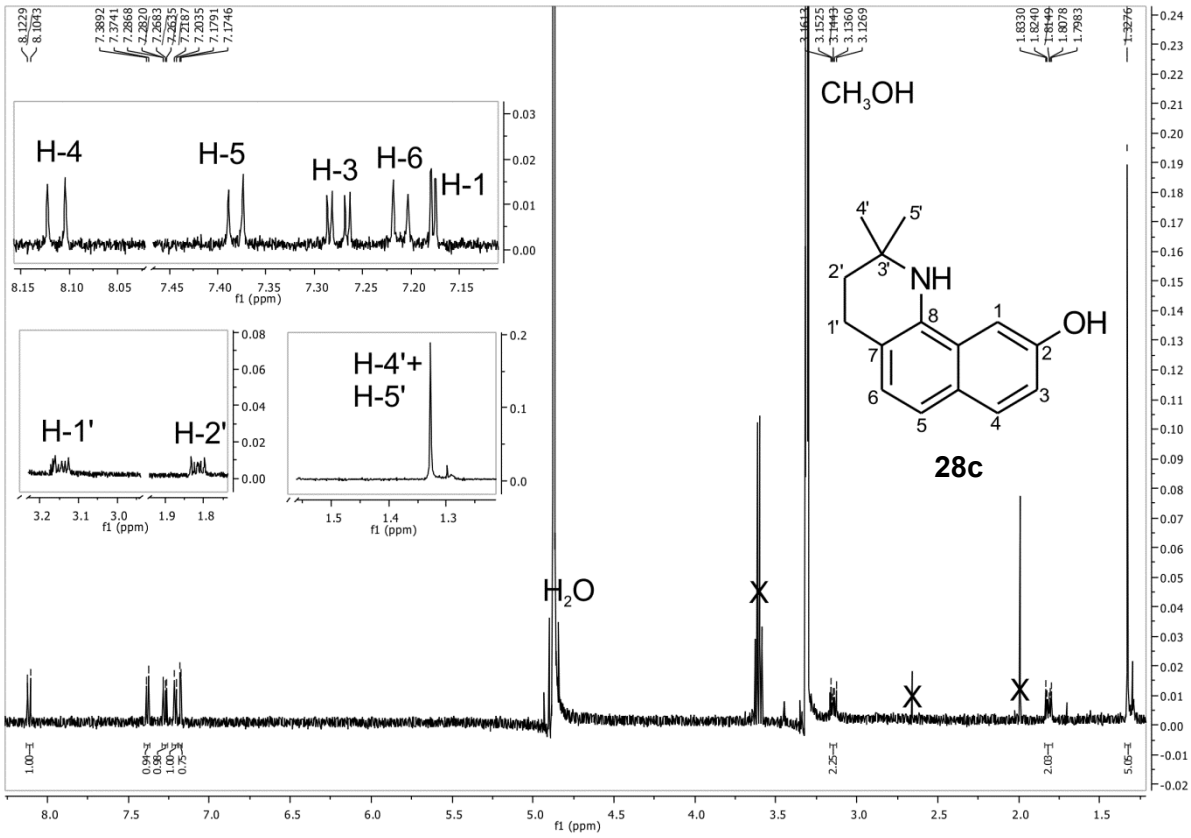


Abbildung 6-61: ^{1}H-NMR-Spektrum des Umlagerungsproduktes (28c), gemessen in CD_3OD (500 MHz).

6.11. Multiproteinsequenzvergleich von FtmPT1 mit C-3-Prenyltransferasen und CTrpPT

```
FtmPT1          ----MPPAPPDQKP-----------------CHQLQPAPYRALSESILFGSVDEERWWHS      39
FtmPT1_G115T    ----MPPAPPDQKP-----------------CHQLQPAPYRALSESILFGSVDEERWWHS      39
AnaPT           ------MSPLSMQTDSVQGTA-ENKSLETNGTSNDQQLPWKVLGKSLGLPTIEQEQYWLN      53
CTrpPT          ----MT-------TY----TLSKGSDRPQTSGDTDGPQPYDVLSKYLRFPDFDQDQWWQN      45
CdpC3PT         ----MT-------------VSSTAVEASAPCAEMGHDIPYRTLSRSMIFANLDQYQYWHQ      43
CdpNPT          MDGEMTASPPDISACDTSAVDEQTGQSGQSQAPIPKDIAYHTLTKALLFPDIDQYQHWHH      60
                                                      : .* . : :  .:: : *

FtmPT1          TAPILSRLLISSNYDVDVQYKYLSLYRHLVLPALGPYPQRDPETGIIATQWRSGMVLTGL      99
FtmPT1_G115T    TAPILSRLLISSNYDVDVQYKYLSLYRHLVLPALGPYPQRDPETGIIATQWRSGMVLTGL      99
AnaPT           TAPYFNNLLIQCGYDVHQQYQYLAFYHRHVLPVLGPFIRSSAEA-----NYISGFSAEGY     108
CTrpPT          TAPMLGKLLSQCKYNVHQQYQHLCLYGLHVIPFLGPWPDIQRSK-----LYKSVLSGL-G      99
CdpC3PT         IGPVLGKMLVDGEYSIHRQYEYLSLFAHLIIPKLGPFPSPGRD------IYRCLLGNIGG      97
CdpNPT          VAPMLAKMLVDGKYSIHQQYEYLCLFAQLVAPVLGPYPSPGRD------VYRCTLGGN-M     113
                 .* : .:* .  *.:. **::*.::   : * ***:     .       : . :

FtmPT1          PIEFSNNVAR--ALIRIGVDPVTADSGTAQDPFNTTRPKVYLETAARLL-PGVDLTRFYE     156
FtmPT1_G115T    PIEFSNNVAR--ALIRITVDPVTADSGTAQDPFNTTRPKVYLETAARLL-PGVDLTRFYE     156
AnaPT           PMELSVNYQASKATVRLGCEPVGEFAGTSQDPMNQFMTREVLGRLSRLD-PTFDLRLFDY     167
CTrpPT          SLEFSQNFTKTGKTVRMGFEPTTFIASTSRDVCNRHCLGKVLNRFKQLD-IKLDLQLYHQ     158
CdpC3PT         PFELSQNFQRLGSTARLAFEPTSYLASTSADPFNRHAVHATLAELRMTGSATVDLELHHA     157
CdpNPT          TVELSQNFQRSGSTTRIAFEPVRYQASVGHDRFNRTSVNAFFSQLQLLV-KSVNIELHHL     172
                 .*:* *        *:  :*.   :... *  *       :          .::  .

FtmPT1          FETELVITKAEEAVLQAN---PDLFRSPWKSQILTAMDLQKSGTVLVKAYFYPQPKSAVT     213
FtmPT1_G115T    FETELVITKAEEAVLQAN---PDLFRSPWKSQILTAMDLQKSGTVLVKAYFYPQPKSAVT     213
AnaPT           FDSQFSLTTSEANLAASK------LIKQRRQSKVIAFDLKDGA-IIPKAYFFLKGKSLAS     220
CTrpPT          LVNEVSLTDQEENTLLER---AILDDEPAKSQSLLALDFNKDD-VTVKLYLYPQLKSLAT     214
CdpC3PT         LAADLTLTDRNEQLL-----TAELAKTNWKSQILLALDLNKTG-ITVKEYFYPALKAAAT     211
CdpNPT          LSEHLTLTAKDERNLNEEQLTKYLTNFQVKTQYVVALDLRKTG-IVAKEYFFPGIKCAAT     231
                :  .. :*  :                  : . : *:*:..   :  * *::   *. .:

FtmPT1          GRSTEDLLVNAIRKVDREGR---FETQLANLQRYIERRRRGLHVPGVTADKPPATAADKA     270
FtmPT1_G115T    GRSTEDLLVNAIRKVDREGR---FETQLANLQRYIERRRRGLHVPGVTADKPPATAADKA     270
AnaPT           GIPVQDVAFNAIESIAPKQIESPLRVLRTFVTKLFSKP----------------------     258
CTrpPT          GIPRTQLMFSAVRNVDKTRA---FSESMNMIEEYFTSV----------------------     249
CdpC3PT         GHSVAELCFSAIRKVDVQGR---LAAPCKAIEAHMQRQ----------------------     246
CdpNPT          GQTGSNACFGAIRAVDKDGH---LDSLCQLIEAHFQQS----------------------     266
                *    :  . *:. :        :      :   :

FtmPT1          FDACSFFPHFLSTDLVEPGKSRVKFYASERHVNLQMVEDIWTFGGLRRDPDALRGLELLR     330
FtmPT1_G115T    FDACSFFPHFLSTDLVEPGKSRVKFYASERHVNLQMVEDIWTFGGLRRDPDALRGLELLR     330
AnaPT           --TVTSDVFILAVDCIVPEKSRIKLYVADSQLSLATLREFWTLGGSVTDSATMKGLEIAE     316
CTrpPT          --RANAAPYWISCDLVEPNKTRFKIYIALFQVNFENAVSMWTLGNRITDPETMRGLAMVR     307
CdpC3PT         ---TQTDIHFLSVDLVEPGTTRFKLYLMELEVTLAKLEEHWTLGGTLTDKETMRGLQMIR     303
CdpNPT          ----KIDDAFLCCDLVDPAHTRFKVYIADPLVTLARAEEHWTLGGRLTDEDAAVGLEIIR     322
                          :. * : *  :*.*.*     :.:    . **:*    *  :  ** : .

FtmPT1          HFWADIQMREGYYTMPRGFCELGKSSAGFEAPMMFHFHLDGSQSPFPDPQMYVCVFGMNS     390
FtmPT1_G115T    HFWADIQMREGYYTMPRGFCELGKSSAGFEAPMMFHFHLDGSQSPFPDPQMYVCVFGMNS     390
AnaPT           ELWRILQYDDAVCSHSN----------MDQLPLVVNYELS-SGSATPKPQLYLPLHGRND     365
CTrpPT          DLWNSFDIQDGLREQKNRPGNPGD--PSNIVPMLFNLEIL-PGKAYPQPKIYFPTTGMND     364
CdpC3PT         ELWVDLEIVDGKRAEPQRPSLPGD--PLSIVPFFMNYEIT-PGQPLPKPKFYFPLIGIPE     360
CdpNPT          GLWSELGIIQGPLEPSA-----MM--EKGLLPIMLNYEMK-AGQRLPKPKLYMPLTGIPE     374
                 :*  :   :.                    *:... .:    .  *.*::*.   *  .

FtmPT1          RKLVEGLTTFYRRVGWEEMASHYQANFLANYPDEDFEKAAHLCAYVSFAYK-NGGAYVTL     449
FtmPT1_G115T    RKLVEGLTTFYRRVGWEEMASHYQANFLANYPDEDFEKAAHLCAYVSFAYK-NGGAYVTL     449
AnaPT           EAMANALTKFWDYLGWKGLAAQYKKDLYANNPCRNLAETTTVQRWVAFSYTESGGAYLTV     425
CTrpPT          LDVAKVMVEFFKRHGLHEHAQSYIDNLASYV----------------------------     395
CdpC3PT         LKIANVLAAFFERHGMHDLARVYPENLQSYYPGEDLAIATDRQAWLSISYTEEKGPYLTM     420
CdpNPT          TKIARIMTAFFQRHDMPEQAEVFMENLQAYYEGKNLEEATRYQAWLSFAYTKEKGPYLSI     434
                  :.. :. *:        *  :  :: :

FtmPT1          YNHSFNPVGDVSFPN          464
FtmPT1_G115T    YNHSFNPVGDVSFPN          464
AnaPT           YFHAVGGMKGNL---          437
CTrpPT          ---------------          395
CdpC3PT         YYH------------          423
CdpNPT          YYFWPE---------          440
```

Abbildung 6-62: Multiproteinsequenzvergleich von FtmPT1 mit C-3-Prenyltransferasen und CTrpPT (Clustal Omega 1.2.1). G115 in FtmPT1 und die entsprechenden Aminosäuren der anderen Proteine sind schwarz unterlegt. FtmPT1 (AAX56314.1) und CdpNPT (ABR14712.1) sind aus *A. fumigatus*, AnaPT (EAW16181.1) und CdpC3PT (EAW17508.1) sind aus *N. fischeri*. CTrpPT (BAE62662.1) ist aus *A. oryzae*. FtmPT1_G115T wurde durch zielgerichtete Mutagenese von FtmPT1 erhalten.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Molekularbiologische und biochemische Untersuchungen
zu Prenyltransferasen und NRPS-ähnlichen Enzymen
aus Ascomyceten“

selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, am 13.06.2014

(Sylwia Tarcz)

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Shu-Ming Li für die durchgehend hervorragende Betreuung und die Unterstützung meiner Arbeit. Seine Tür stand immer für mich offen, wobei er stets ein offenes Ohr für Ideen und konstruktive Lösungsvorschläge für Probleme parat hatte. Außerdem danke ich ihm, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, bei meinem Forschungsaufenthalt das Land China kennenzulernen.

Prof. Dr. Keusgen danke ich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Stehle und seinen Mitarbeitern der Universität Tübingen danke ich für die Möglichkeit zur Kooperation im Rahmen der Strukturaufklärung der FtmPT1. Frau Dr. Xie danke ich für die Aufnahme der 2D-NMR-Spektren an den Avance Spektrometern. Herrn Dr. Kämpchen und Herrn Newel danke ich für die Aufnahme der NMR-Spektren und die hervorragende Beratung zu jeder Zeit. Frau Dr. Laufenberg und Frau Zitzer danke ich für die Durchführung und die Beratung im Rahmen der massenspektrometrischen Messungen. Herrn Dr. Linne und Herrn Bamberger danke ich für die Durchführung der LC/MS-Messungen. Mein Dank geht außerdem im Hans-Knöll-Institut in Jena an Prof. Dr. Hoffmeister für die Zurverfügungstellung des Expressionskonstruktes pPS1 und an Herrn Dr. Brock für den *A. terreus*-Stamm A1156. Herrn Prof. Dr. Meggers und Frau Kräling danke ich für die Zurverfügungstellung des CD-Spektrometers.

Allen meinen ehemaligen und aktuellen Kollegen am Institut für Pharmazeutische Biologie und Biotechnologie danke ich für die sehr freundliche Zusammenarbeit, die vielen Feste, die zahlreichen neuen Ideen und für alle lustigen Momente innerhalb und außerhalb des Instituts. Ganz herzlich möchte ich mich insbesondere bei Beate, Edyta und Lena für die freundliche Zurverfügungstellung ihrer synthetisierten Substanzen bedanken. Der ganzen Mensatruppe gebührt ebenfalls großer Dank für die auflockernden Momente in den Mittagspausen und natürlich auch Alex, Daniel, Florian und Stefan für die zahlreichen Tassen Kaffee. Edyta möchte ich außerdem für ihre besondere Unterstützung in der Anfangszeit meiner Arbeit danken. Kathrin und Carsten danke ich für ihre Tipps bei der Protoplastierung und Transformation. Danke auch an Beate für die schöne Zeit in China und zusammen mit Anne und Matthias für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Thank you Suqin for the great time and all your support during our stay in China.

Zum Schluss möchte ich meiner Familie für die Unterstützung und Förderung über all die Jahre bedanken. Mein besonderer Dank geht an Sebastian für seine unendliche Unterstützung und Geduld während all der Zeit und für das sorgfältige Korrekturlesen dieser Dissertation. Danke, dass du immer für mich da bist!

Curriculum vitae

Die Seite 228 (*Curriculum vitae*) enthält persönliche Daten. Sie ist deshalb nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.